

7a5/Prognostin und dessen Verwendung für die Tumordiagnostik und Tumorthherapie

Die vorliegende Erfindung betrifft die Nukleinsäuresequenz, die für das Polypeptid von 7a5/Prognostin kodiert und dessen Verwendungen, insbesondere für die Tumordiagnostik und Tumorthherapie bei metastasierenden Tumoren. Alle hier zitierten Referenzen sind hiermit für die Zwecke der vorliegenden Erfindung in ihrer Gesamtheit durch Bezugnahme mit aufgenommen.

Beschreibung

Die Entstehung von Metastasen ist ein komplexer mehrstufiger Prozeß, der eine Vielzahl molekularer und zellulärer Veränderungen umfaßt, und prinzipiell in vier definierte Phasen eingeteilt werden kann: a) Wachstum und Vaskularisierung des Primärtumors, b) Ablösen und Eindringen einzelner invasiver Zellen in das Gefäßsystem, c) Dissemination im Gefäßsystem und Extravasation am Zielorgan, und schließlich d) Bildung von Makrometastasen aus den eingewanderten Tumorzellen.

So verlieren bestimmte Zellen eines Primärtumors den Zell-Zell-Kontakt, invadieren durch die extrazelluläre Matrix und werden über Blut- und Lymphsystem verbreitet. Diese Tumorzellen können schließlich extravadiieren, sich an bestimmte Zielorgane anheften und dort proliferieren, was zur Ausbildung von Metastasen führt.

Eine Reihe von generell Metastasierungs-assoziierten Molekülen wurden bereits beim Vergleich von Primärtumor und Metastase identifiziert. So führt die Fehlregulation von Zelladhäsionsmolekülen (z.B. Cadherine) in Primärtumoren zum Verlust des Zell-Zell-Kontakts und ermöglicht den mobilisierten Tumorzellen die Invasion und das Eindringen in Blut- und Lymphgefäßsystem. Tumorzellen, die durch Blut- und Lymphgefäßsystem im Körper verteilt wurden, heften sich an die Endothelzellen der Gefäße, vermittelt durch Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen (z.B. E-Selectin, LP AM, VCAM-1, LuECAM-1, ICAM-1), an die bestimmte Oberflächenmoleküle der Tumorzellen (z.B. VLA-4, LFA-1) selektiv binden können. Im weiteren Verlauf der Metastasierung muß eine Bindung der metastasierenden Tumorzellen an die Komponenten der extrazellulären Matrix erfolgen, z.B. an Laminin, Collagene

Fibronectin und Vitronectin. Dies wird durch verschiedene Integrine vermittelt, Tumorzellen mit unterschiedlichem Metastasierungspotential unterscheiden sich in der Adhäsion zu den verschiedenen Elementen der extrazellulären Matrix. Von großer Bedeutung für die Extravasation und die Migration der Tumorzellen sind weiterhin die Matrix-degradierenden Enzyme, z.B. die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs, insbesondere MMP-9 und MMP-2) im System mit ihren Gewebe-Inhibitoren (Tissue Inhibitors of MMPs, TIMPs). Die Aktivität dieser Moleküle kann über das System Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator/Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator-Rezeptor (uPA/uPA-Rezeptor) gewebespezifisch reguliert werden, gezeigt z.B. für die Expression von MMP-9 bei Lebermetastasen kolorektaler Karzinome.

Für die Adhäsion von metastasierenden Tumorzellen an die Zielorgane sind wiederum spezifische Adhäsionsmoleküle (VCAM-1, LPAM, E-Selectin, VLAs, ICAM-1 und verschiedene Integrine) entscheidend [siehe unter anderem Streit M, et al. Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. *Recent Results Cancer Res.* 1996;142:19-50. Imai K, et al. Regulation of integrin function in the metastasis of colorectal cancer *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 1998 Jul;99(7):415-8. Krause T, Turner GA. Are selectins involved in metastasis? *Clin Exp Metastasis.* 1999 May;17(3):183-92, und Portera CA Jr, et al. Molecular determinants of colon cancer metastasis. *Surg Oncol.* 1998 Nov-Dec;7(3-4):183-95.]. An den Metastasierungszielorganen müssen die Tumorzellen eine bestimmte Mikro-Umgebung vorfinden, um adhären und proliferieren zu können ("seed and soil-Hypothese"). Tumorzellen können sich zunächst im gesamten Körper verteilen, aber dann nur in bestimmten Organen Metastasen generieren. Der entscheidende Faktor der Metastasierung ist demnach nicht die Migration der Tumorzellen zu den Zielorganen, sondern das Potential der Tumorzellen, in einer bestimmten Umgebung im Zielorgan zu proliferieren. "Schlafende" Tumorzellen können oft jahrelang im Körper vorhanden sein, ohne daß Metastasen nachweisbar sind.

Die oben beschriebene "seed and soil-Hypothese" ist eine der am meisten akzeptierten Theorien für die organspezifische Metastasierung. Daneben existiert eine zweite Theorie, nach der Endothelzellen in den Blutgefäßen der Metastasierungs-Zielorgane bestimmte Adhäsionsmoleküle exprimieren, wodurch zirkulierende Tumorzellen dort festgehalten werden und somit die Metastasierung in diesen spezifischen Organen stattfindet. Die dritte, sogenannte Chemoattraktions-Theorie besagt, daß organspezifische Moleküle in den Blutkreislauf gelangen, die

die zirkulierenden Tumorzellen dazu anregt, zu den entsprechenden Metastasierungsorganen zu wandern und dort Metastasen auszubilden.

Die bisherigen Untersuchungen zur organspezifischen Metastasierung machen deutlich, daß offensichtlich in einem längeren Prozeß Gene selektiv angeschaltet (oder abgeschaltet) werden müssen, die zum Zeitpunkt der Verbreitung der Tumorzellen im Körper noch nicht aktiv (bzw. noch aktiv) sind. Daher sind Genexpressions-Analysen unabdingbar, die untersuchen, welche Gene in Metastasen bestimmter Zielorgane im Vergleich zu den entsprechenden Primärtumoren verschieden exprimiert werden.

Jährlich werden ca. 20000 Neuerkrankungen für das Kolonkarzinom in der Bundesrepublik registriert. Für das Kolonkarzinom sind verschiedene Metastasierungsorte bekannt, z.B. Leber, Lymphknoten, Lunge, Knochen und Hirn.

Die Robert-Rössle-Klinik ist eine onkologisch orientierte Klinik mit dem Schwerpunkt Chirurgie. Pro Jahr werden ca. 300 Patienten mit Kolonkarzinomen behandelt, davon weisen ca. 150-170 Patienten Metastasen des Primärtumors auf. Die beobachtete Metastasierungsfrequenz der Zielorgane entspricht der in der Literatur beschriebenen, mit 80% Lebermetastasen und 15% Lungenmetastasen. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt ca. 20-25%, bei solitären Metastasen (Leber, Lunge) allerdings nur etwa 5%.

Die Leber stellt das bedeutsamste Zielorgan für die Metastasierung des Kolonkarzinoms dar, da die Tumorzellen - vermittelt über die Pfortader - in der Leber festgehalten werden und sich danach zu anderen Organen ausbreiten.

Jedoch ist auch bekannt, daß oftmals Metastasen z.B. in der Lunge oder im Knochen vorhanden sind, ohne daß Metastasen in der Leber festgestellt wurden. Damit stellt das metastasierende Kolonkarzinom ein interessantes Modell für die Identifizierung und Analyse von Genen dar, um eine differentielle Genexpression bei der organspezifischen Metastasierung weiter zu untersuchen.

Die von derartigen Genen kodierten Proteine könnten eine direkte Funktion für die Adhäsion von Tumorzellen an bestimmte Gewebe und Organe haben (organspezifische Adhäsionsmoleküle). Ebenso könnten sie durch Wechselwirkungen mit den normalen Zellen der Metasta-

sierungsorgane die Zellproliferation und das Wachstum der Metastasen in einer bestimmten Umgebung ermöglichen (z.B. spezifische Rezeptoren und Effektoren). Weiterhin ist denkbar, daß solche Proteine für die intrazelluläre Vorbereitung der Tumorzellen auf die Metastasierung in einem bestimmten Zielorgan benötigt werden, so innerhalb verschiedener Signaltransduktionskaskaden und Regulationsmechanismen. In diesem Zusammenhang sind Proteine mit entsprechenden Protein-Protein-Interaktionsdomänen von Bedeutung, z.B. mit Src-Homology-Domains (SH3-, SH2-Domänen) oder Eps15-Homology-Domains (EH-Domänen). Diese Domänen sind definierte Sequenzmotive, die eine spezifische Bindung an Liganden ermöglichen. SH3-Domänen sind u.a. in solchen Proteinen vorhanden, die bestimmte Liganden zu Kinasen oder deren Substraten geleiten und daher eine wichtige Rolle bei der Regulation von Tyrosinkinase-Signaltransduktionswegen spielen.

Insbesondere ist die Identifizierung solcher Markergene wertvoll, anhand deren Expression im primären Karzinom eine wahrscheinliche Metastasierung in bestimmte Zielorgane vor dem eigentlichen Metastasierungsereignis prognostiziert und, basierend darauf, evtl. verhindert werden kann.

Es ist somit eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, solche weiteren Markergene zur Verfügung zu stellen, mit denen eine verbesserte Diagnose und Therapie im Hinblick auf Metastasierung in bestimmte Zielorgane erreichen läßt.

Gemäß einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird diese Aufgabe durch das zur Verfügung stellen einer Nukleinsäuresequenz gelöst, die für das Polypeptid von 7a5/Prognostin kodiert, ausgewählt aus der Gruppe: a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No: 1 angegebenen Sequenz, b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID No: 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz ableiten, c) Derivate der in SEQ ID No: 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz, die für die Polypeptide mit der in SEQ ID No: 2 angegebenen Aminosäuresequenz kodieren und mindestens 80% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die biologische Aktivität der Polypeptide wesentlich reduziert ist, und d) einer humanen genomischen Nukleinsäuresequenz, welche das Gen für 7a5/Prognostin umfaßt und Polymorphismen aufweist. Ein weiterer Aspekt betrifft das ebenfalls zur Verfügung gestellte 7a5/Prognostin-Polypeptid, kodiert durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, insbesondere nach der Aminosäuresequenz der SEQ ID No: 2.

Zur Aufreinigung der erfindungsgemäßen Polypeptide kann ein weiteres/weiterer Polypeptid("tag") angefügt sein. Protein-tags erlauben beispielsweise die hochaffine Absorption an eine Matrix, stringentes Waschen mit geeigneten Puffern, ohne den Komplex in nennenswertem Maße zu eluieren und anschließend gezielte Elution des absorbierten Komplexes. Beispiele der dem Fachmann bekannten Protein-tags sind ein (His)₆-tag, ein V5-tag, ein Myc-tag, ein FLAG-tag, ein Strep-tag, ein Strep-tag II, ein Hämagglutinin-tag, Glutathion-Transferase (GST)-tag, Intein mit einem Affinitäts-Chitin-binding-tag oder Maltose-bindendes Protein (MBP)-tag. Diese Protein-tags können sich N-, C-terminal und/oder intern befinden.

Neben den aus Zellen isolierten natürlichen Polypeptiden können alle erfindungsgemäßen Polypeptide oder deren Teile unter zellfreien Bedingungen hergestellt worden sein, z. B. durch Synthese oder durch *in vitro*-Translation. So kann das gesamte Polypeptid oder Teile davon zum Beispiel mit Hilfe der klassischen Synthese (Merrifield-Technik) synthetisiert werden. Teile der erfindungsgemäßen Polypeptide eignen sich insbesondere zur Gewinnung von Antisera, mit deren Hilfe geeignete Genexpressionsbanken durchsucht werden können, um so zu weiteren funktionellen Varianten des erfindungsgemäßen Polypeptids zu gelangen.

Neben den aus Zellen isolierten natürlichen Nukleinsäuren können alle erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder deren Teile auch synthetisch hergestellt worden sein. Weiterhin kann zur Durchführung der Erfindung eine Nukleinsäure verwendet werden, die synthetisch hergestellt worden ist. So kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure beispielsweise chemisch anhand der in den von SEQ ID No. 2 beschriebenen Proteinsequenzen unter Heranziehen des genetischen Codes z. B. nach der Phosphotriester-Methode synthetisiert werden (siehe z. B. Uhlmann & Peyman 1990, Chemical Reviews 90:543-584).

Die Zugangsnummer XP_294213.1 (eingetragen am 28-APR-2003 in die Datenbank) beschreibt ein menschliches Polypeptid mit einer Länge von 816 Aminosäuren. Diese als ähnlich zu dem EST AI594717 [*Homo sapiens*] beschriebene Sequenz entspricht in den letzten 813 Aminosäuren der SEQ ID No. 2 und wurde aus NCBI contig NT_007819 durch eine automatisierte Computeranalyse mittels des Programms "GenomeScan" erzeugt. Das Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert. Es sind weder Funktion und noch prognostischer Wert für dieses Gen bekannt. Die vorliegende Erfindung stellt somit die Identifizierung der genomischen

DNA-Sequenz, der Vollängen-cDNA und die der putativen Proteinsequenz für 7a5/Prognostin zur Verfügung.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Oligonukleotid, das spezifisch an eine Nukleinsäuresequenz gemäß der vorliegenden Erfindung hybridisiert. Oligonukleotide stellen wichtige Werkzeuge dar, die zum einen in PCR-Reaktionen, aber auch als Sonden in Hybridisierungsreaktionen verwendet werden können. Weitere Verwendungsmöglichkeiten sind als Therapeutika in der z.B. Gentherapie oder in Mutagenesetechniken vorhanden. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können in Form von Nukleinsäuren umfassend DNA, dsDNA, RNA, mRNA, siRNA, PNA und/oder CNA vorliegen. Die Oligonukleotide können weiterhin als "sense"- oder "antisense"-Oligonukleotide vorliegen. Für auf Hybridisierung basierende Nachweistechiken können die Oligos darüber hinaus geeignet markiert sein, zum Beispiel durch Farbstoffe, Radionuklide, Enzyme oder Massen- oder Ladungsmarker. Die Markierung richtet sich nach dem jeweiligen Nachweisverfahren, das angewendet werden soll. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide sind vorzugsweise eine DNA, insbesondere eine doppelsträngige DNA mit einer Länge von mindestens 8 Nukleotiden, vorzugsweise mit mindestens 12 Nukleotiden, insbesondere mit mindestens 24 Nukleotiden. Die Obergrenze für Oligonukleotide wird durch die jeweilige praktische Verwendung bestimmt, wobei üblicherweise maximale Länge von 50-200 Nukleotiden bevorzugt sind.

Oligonukleotide werden in der Regel schnell durch Endo- oder Exonukleasen, insbesondere durch in der Zelle vorkommende DNasen und RNasen, abgebaut. Deshalb ist es vorteilhaft, die Nukleinsäure zu modifizieren, um sie gegen den Abbau zu stabilisieren, so daß über einen langen Zeitraum eine hohe Konzentration der Nukleinsäure in der Zelle beibehalten wird (Beigelman et al. 1995, Nucleic Acids Res. 23:3989-94; Dudycz 1995, WO 95/11910; Macadam et al. 1998, WO 98/37240; Reese et al. 1997, WO 97/29116). Typischerweise kann eine solche Stabilisierung durch die Einführung von einer oder mehrerer Internukleotid-Phosphatgruppen oder durch die Einführung einer oder mehrerer Nicht-Phosphor-Internukleotide, erhalten werden.

Geeignete modifizierte Internukleotide sind in Uhlmann und Peymann (1990, Chem. Rev. 90:544) zusammengefaßt (siehe auch Beigelman et al. 1995, Nucleic Acids Res. 23:3989-94; Dudycz 1995, WO 95/11910; Macadam et al. 1998, WO 98/37240; Reese et al. 1997, WO 97/29116). Modifizierte Internukleotid-Phosphatreste und/oder nicht-Phosphoresterbindungen

in einer Nukleinsäure, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden können, enthalten zum Beispiel Methylphosphonat, Phosphorothioat, Phosphoramidat, Phosphorodithioat, Phosphatester, während Nicht-Phosphor-Internukleotid-Analoga, beispielsweise Siloxanbrücken, Carbonatbrücken, Carboxymethylester, Acetamidatbrücken und/oder Thiobrücken enthalten. Es ist auch beabsichtigt, daß diese Modifizierung die Haltbarkeit einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die bei einer der erfindungsgemäßen Verwendungen eingesetzt werden kann, verbessert.

Für die Expression des betreffenden Gens ist im allgemeinen eine doppelsträngige DNA bevorzugt, wobei der für das Polypeptid kodierende DNA-Bereich besonders bevorzugt ist. Dieser Bereich beginnt mit dem ersten in einer Kozak-Konsensus-Sequenz (Kozak 1987, Nucleic Acids Res. 15:8125-48) liegenden Start-Codon (ATG) bis zum nächsten Stop-Codon (TAG, TGA bzw. TAA), das im gleichen Leseraster zum ATG liegt. Eine weitere Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen ist die Konstruktion von anti-sense Oligonukleotiden (Zheng und Kemeny 1995, Clin. Exp. Immunol. 100:380-382; Nellen und Lichtenstein 1993, Trends Biochem. Sci. 18:419-23) und/oder Ribozymen (Amarzguioui et al. 1998, Cell. Mol. Life Sci. 54:1175-202; Vaish, et al. 1998, Nucleic Acids Res. 26:5237-42; Persidis 1997, Nat. Biotechnol. 15:921-2; Couture und Stinchcomb 1996, Trends Genet. 12:510-5). Mit "antisense"-Oligonukleotiden kann man die Stabilität der erfindungsgemäßen Nukleinsäure verringern und/oder die Translation der erfindungsgemäßen Nukleinsäure inhibieren. So kann beispielsweise die Expression der entsprechenden Gene in Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* verringert werden. Oligonukleotide können sich daher als Therapeutikum eignen. Für die Verwendung als Sonde oder als "antisense" Oligonukleotid ist eine einzelsträngige DNA oder RNA bevorzugt. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können in Form von Nukleinsäuren umfassend DNA, dsDNA, RNA, mRNA, siRNA, PNA und/oder CNA vorliegen. Ein weiterer besonders bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Oligonukleotide als Therapeutikum in der Form als siRNA. Diese Art der Gentherapie ist dem Fachmann auch für die Tumorthherapie bekannt und kann z.B. aus der folgenden Literatur und den weiteren Referenzen darin entnommen werden. So betreffen Ait-Si-Ali S, Guasconi V, Harel-Bellan A. RNA interference and its possible use in cancer therapy Bull Cancer. 2004 Jan;91(1):15-8; Caplen NJ, Mousses S. Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells. Ann N Y Acad Sci. 2003 Dec;1002:56-62; Caplen NJ. RNAi as a gene therapy approach. Expert Opin Biol Ther. 2003 Jul;3(4):575-86; Lu PY, Xie FY, Woodle MC. siRNA-mediated antitumorigenesis for drug target valida-

tion and therapeutics. *Curr Opin Mol Ther.* 2003 Jun;5(3):225-34; und Oshiumi H, Begum NA, Matsumoto M, Seya T. RNA interference for mammalian cells *Nippon Yakurigaku Zasshi.* 2002 Aug;120(2):91-5 den allgemeinen technologischen Hintergrund, Devroe E, Silver PA. Therapeutic potential of retroviral RNAi vectors. *Expert Opin Biol Ther.* 2004 Mar;4(3):319-27. Devroe E, Silver PA. Retrovirus-delivered siRNA. *BMC Biotechnol.* 2002 Aug 28;2(1):15. Tran N, Cairns MJ, Dawes IW, Arndt GM. Expressing functional siRNAs in mammalian cells using convergent transcription. *BMC Biotechnol.* 2003 Nov 06;3(1):21. Futami T, Miyagishi M, Seki M, Taira K. Induction of apoptosis in HeLa cells with siRNA expression vector targeted against bcl-2. *Nucleic Acids Res Suppl.* 2002;(2):251-2. Scherr M, Battmer K, Ganser A, Eder M. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle.* 2003 May-Jun;2(3):251-7. Shen C, Reske SN. Adenovirus-delivered siRNA. *Methods Mol Biol.* 2004;252:523-32. Salmons B, Gunzburg WH. Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 1993 Apr;4(2):129-41, und Kobayashi N, Matsui Y, Kawase A, Hirata K, Miyagishi M, Taira K, Nishikawa M, Takakura Y. Vector-based in vivo RNA interference: dose- and time-dependent suppression of transgene expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 Feb;308(2):688-93. Epub 2003 Nov 10 betreffen bestimmte Vektoren zur siRNA Therapie. Zuletzt beschreiben Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, Morishita S, Saigo K. siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W124-9 beispielhaft ein Programm zum Design und dem Aufbau von siRNA-Molekülen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül, das erfindungsgemäße Polypeptid oder das erfindungsgemäße Oligonukleotid zur Behandlung von Erkrankungen. Die Möglichkeit der Verwendung dieser Substanzen im Zusammenhang mit menschlichen Erkrankungen war bisher nicht bekannt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, vorzugsweise in Form eines Plasmids, shuttle Vektors, Phagemids, Cosmids, Expressionsvektors, adenoviralen Vektors, retroviralen Vektors (Miller, et al. "Improved retroviral vectors for gene transfer and expression", *BioTechniques* Vol. 7, No. 9, p 980, 1989) und/oder gentherapeutisch wirksamen Vektors, der eine erfindungsgemäße Nukleinsäure enthält. So kann die erfindungsgemäße Nukleinsäure in einem Vektor, vorzugsweise in einem Expressionsvektor oder gentherapeutisch wirksamen Vektor, enthalten sein. Vorzugsweise enthält der gentherapeutisch wirksame Vektor zellspezifische regulatorische Sequenzen, die funktionell mit der erfindungsgemäßen

Nukleinsäure verbunden sind. Die Expressionsvektoren können prokaryontische oder eukaryontische Expressionsvektoren sein. Beispiele für prokaryontische Expressionsvektoren sind für die Expression in *E. coli* z.B. die Vektoren pGEM oder pUC-Derivate und für eukaryontische Expressionsvektoren für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* z. B. die Vektoren p426Met25 oder p426GAL1 (Mumberg et al. 1994, Nucleic. Acids Res. 22:5767-5768), für die Expression in Insektenzellen z. B. *Baculovirus*-Vektoren wie in EP-B1-0 127 839 oder EP-B1-0 549 721 offenbart, und für die Expression in Säugerzellen z. B. die Vektoren Rc/CMV und Rc/RSV oder SV40-Vektoren, welche alle allgemein erhältlich sind.

Im allgemeinen enthalten die Expressionsvektoren auch für die jeweilige Wirtszelle geeignete Promotoren, wie z. B. den trp-Promotor für die Expression in *E. coli* (siehe z. B. EP-B1-0 154 133), den Met 25, GAL 1 oder ADH2-Promotor für die Expression in Hefen (Russel et al. 1983, J. Biol. Chem. 258:2674-2682), den Baculovirus-Polyhedrin-Promotor, für die Expression in Insektenzellen (siehe z. B. EP-B1-0 127 839). Für die Expression in Säugetierzellen sind beispielsweise Promotoren geeignet, die eine konstitutive, regulierbare, gewebsspezifische, zellzyklusspezifische oder metabolischspezifische Expression in eukaryontischen Zellen erlauben. Regulierbare Elemente gemäß der vorliegenden Erfindung sind Promotoren, Aktivatorsequenzen, Enhancer, Silencer und/oder Repressorsequenzen. Beispiel für geeignete regulierbare Elemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die von der RNA Polymerase II erkannt werden oder virale Promotoren, CMV-Enhancer, CMV-Promotor, SV40-Promotor oder LTR-Promotoren z. B. von MMTV (mouse mammary tumour virus; Lee et al. 1981, Nature 214:228-232) und weitere virale Promotor- und Aktivatorsequenzen, abgeleitet aus beispielsweise HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV oder HIV. Beispiele für regulierbare Elemente, die regulierbare Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind der Tetracyclinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen et al. 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5:516-20).

Um die Einführung von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und damit die Expression des Polypeptids in einer eu- oder prokaryontischen Zelle durch Transfektion, Transformation oder Infektion zu ermöglichen, kann die Nukleinsäure als Plasmid, als Teil eines viralen oder nicht-viralen Vektors vorliegen. Als virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Retroviren, Baculoviren, Vakziniaviren, Adenoviren, adenoassoziierte Viren und Herpesviren. Als nicht-virale Vektoren eignen sich hierbei besonders: Virosomen, Liposomen, kationische Lipide, oder poly-Lysin konjugierte DNA.

Beispiele von gentherapeutisch wirksamen Vektoren sind Virusvektoren, beispielsweise Adenovirusvektoren oder retrovirale Vektoren (Lindemann et al., 1997, Mol. Med. 3:466-76; Springer et al. 1998, Mol. Cell. 2:549-58).

Ein bevorzugter Mechanismus, erfindungsgemäße Polypeptide *in vivo* zur Expression zu bringen, ist der virale Gen-Transfer, insbesondere mit Hilfe retroviraler Partikel. Diese werden vorzugsweise genutzt, entsprechende Zielzellen, vorzugsweise T-Lymphozyten, des Patienten *ex vivo* mit den für erfindungsgemäße Polypeptide kodierenden Genen oder Nukleotidsequenzen durch Transduktion zu versehen. Die Zielzellen können daraufhin im Sinne eines adoptiven Zelltransfers wieder in den Patienten reinfundiert werden, um mit der *de novo* eingefügten Spezifität tumorizide und/oder immunmodulierende Effektorfunktionen zu übernehmen. Es wurden auf diesem Wege sehr gute gentherapeutische Erfolge in der Behandlung der durch Immuninkompetenz gekennzeichneten SCID-X1- Krankheit bei Neugeborenen erzielt, indem hämatologische Vorläuferzellen mit einem analogen intakten Transgen einer in den Kindern vorkommenden nicht-funktionellen mutierten Variante des χ -Kettengens, das für die Differenzierung in die verschiedenen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems essentiell ist, retroviral versehen wurden (Cavazzana-Calvo et al., 2000).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, den Gentransfer *in vivo* durchzuführen, einerseits durch präferentiell stereotaktische Injektion der infektiösen Partikel, andererseits durch direkte Applikation von Viren-produzierenden Zellen (Oldfield, et al. Hum. Gen. Ther., 1993, 4:39-69).

Die zum Transfer von Genen häufig eingesetzten viralen Vektoren sind nach heutigem Stand der Technik vorwiegend retrovirale, lentivirale, adenovirale und adeno-assoziierte virale Vektoren. Diese sind von natürlichen Viren abgeleitete zirkuläre Nukleotidsequenzen, in denen zumindest die viralen Strukturprotein-kodierenden Gene durch das zu transferierende Konstrukt ausgetauscht werden. Neue, nicht-virale Vektoren bestehen aus autonomen, sich selbst-integrierenden DNS-Sequenzen, den Transposonen, die durch z.B. liposomale Transfektion in die Wirtszelle eingeschleust werden und erstmals erfolgreich zur Expression humaner Transgene in Säugerzellen eingesetzt wurden (Yant et al., 2000).

Gentherapeutisch wirksame Vektoren lassen sich auch dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Liposomen komplexiert, da damit eine sehr hohe Transfektio-

onseffizienz, insbesondere von Hautzellen, erreicht werden kann (Alexander und Akhurst 1995, Hum. Mol. Genet. 4:2279-85). Bei der Lipofektion werden kleine unilamellare Vesikel aus kationischen Lipiden durch Ultraschallbehandlung der Liposomensuspension hergestellt. Die DNA wird ionisch auf der Oberfläche der Liposomen gebunden, und zwar in einem solchen Verhältnis, daß eine positive Nettoladung verbleibt und die Plasmid-DNA zu 100% von den Liposomen komplexiert wird. Neben den von Felgner et al. (1987, supra) eingesetzten Lipidmischungen DOTMA (1,2-Dioleoyloxypropyl-3-trimethylammoniumbromid) und DPOE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) wurden inzwischen zahlreiche neue Lipidformulierungen synthetisiert und auf ihre Effizienz der Transfektion verschiedener Zelllinien getestet (Behr et al. 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6982-6986; Felgner et al. 1994, J. Biol. Chem. 269:2550-25561; Gao und Huang. 1991, Biochim. Biophys. Acta 1189:195-203). Beispiele der neuen Lipidformulierungen sind DOTAP N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat oder DOGS (TRANSFECTAM; Dioctadecylamidoglycylspermin). Hilfsstoffe, die den Transfer von Nukleinsäuren in die Zelle erhöhen, können beispielsweise Proteine oder Peptide, die an DNA gebunden sind oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle, die den Transport der Nukleinsäure in den Kern der Zelle ermöglichen, sein (Schwartz et al. 1999, Gene Therapy 6:282; Brandén et al 1999, Nature Biotech. 17:784). Hilfsstoffe umfassen auch Moleküle, die die Freisetzung von Nukleinsäuren in das Cytoplasma der Zelle ermöglichen (Kiehler et al 1997, Bioconj. Chem. 8:213) oder beispielsweise Liposomen (Uhlmann und Peymann 1990, supra). Eine andere besonders geeignete Form von gentherapeutischen Vektoren läßt sich dadurch erhalten, daß man die erfindungsgemäße Nukleinsäure auf Goldpartikeln aufbringt und diese mit Hilfe der sogenannten "Gene Gun" in Gewebe, bevorzugt in die Haut, oder Zellen schießt (Wang et al., 1999, J. Invest. Dermatol. 112:775-81). Ein weiterer Aspekt betrifft die Einbringung "nackter DNA" mit der Gene gun, wie zum Beispiel in T Niidome und L Huang; Gene Therapy Progress and Prospects: Nonviral vectors; Gene Therapy (2002) 9, 1647-1652 und den Referenzen darin beschrieben.

Für die gentherapeutische Anwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäure ist es auch von Vorteil, wenn der Teil der Nukleinsäure, der für das Polypeptid kodiert, ein oder mehrere nicht kodierende Sequenzen einschließlich Intronsequenzen, vorzugsweise zwischen Promotor und dem Startcodon des Polypeptids, und/oder eine polyA-Sequenz, insbesondere die natürlich vorkommende polyA-Sequenz oder eine SV40 Virus polyA-Sequenz, vor allem am 3'-Ende des Gens enthält, da hierdurch eine Stabilisierung der mRNA erreicht werden kann

(Jackson 1993, Cell 74:9-14 und Palmiter et al. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:478-482).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann einen rekombinanten prokaryontischer oder eukaryontischer Wirtsorganismus, der mindestens eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder mindestens einen erfindungsgemäßen Vektor enthält. Der Wirtsorganismus kann aus einer diploiden Zelle, einer Pflanzenzelle, einer Säugerzelle, einer Nematodenzelle, einer Fischzelle, einer Insektenzelle und, insbesondere, einer nicht-menschlichen Stammzelle bestehen. Ein bevorzugtes Beispiel wäre eine Maus-Stammzelle. Weiterhin stellt die Erfindung einen rekombinanten nicht-menschlichen Organismus zur Verfügung, insbesondere einen genetisch defizienten oder "Knock-out"-Säuger (wie eine Ziege oder Schaf), -Nager (wie ein Kaninchen, Maus, Ratte oder Hamster), -Nematode (wie *Caenorhabditis elegans*), -Fisch (wie ein Zebrafisch), -Pflanze (wie *Arabidopsis thaliana*, Mais, Reis, Weizen oder Kartoffel), -Insekt oder Qualle, bei dem das entsprechende Gen für 7a5/Prognostin mutiert oder deletiert wurde. Diese Versuchsorganismen sind wertvolle Hilfsmittel und können z.B. zum Screening nach Bindungspartnern verwendet werden (siehe z.B. unten). Verfahren zur Herstellung solcher Organismen sind dem Fachmann aus der einschlägigen Literatur bekannt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein polyklonaler oder monoklonaler Antikörper oder ein Antigen-bindendes Fragment davon zur Diagnose, Prognose und Therapie-Optimierung von mit 7a5/Prognostin-Expression assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, der gegen ein erfindungsgemäßes Polypeptid gerichtet ist und mit den erfindungsgemäßen Polypeptiden spezifisch reagiert, wobei die oben genannten Teile des Polypeptids entweder selbst immunogen sind oder durch Kopplung an geeignete Träger, wie z. B. bovines Serumalbumin, immunogen gemacht bzw. in ihrer Immunogenität gesteigert werden können. Dieser Antikörper ist entweder polyklonal oder monoklonal, bevorzugt ist ein monoklonaler Antikörper. Unter dem Begriff Antikörper versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung auch gentechnisch hergestellte und gegebenenfalls modifizierte Antikörper bzw. antigenbindende Teile davon, wie z.B. chimäre Antikörper, humanisierte Antikörper, multifunktionelle Antikörper, bi- oder oligospezifische Antikörper, einzelsträngige Antikörper, F(ab)- oder F(ab)₂-Fragmente (siehe z.B. EP-B1-0 368 684, US 4,816,567, US 4,816,397, WO 88/01649, WO 93/06213, WO 98/24884). Die erfindungsgemäßen Antikörper können zur Diagnose, Therapie-Überwachung und/oder Behand-

lung von mit 7a5/Prognostin-Expression assoziierten Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen verwendet werden. Ein weiterer Aspekt betrifft die Herstellung von Antikörpern (pAK, mAK) für die Evaluierung histologischer Schnitte.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers, vorzugsweise eines polyklonalen oder monoklonalen Antikörpers zur Diagnose und/oder Behandlung von mit 7a5/Prognostin-Expression Erkrankungen oder zur Identifizierung von pharmakologisch aktiven Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Antikörper produzierender Organismus mit einem erfindungsgemäßen Polypeptid oder funktioneller Äquivalente davon oder Teile davon mit mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise mit mindestens 8 Aminosäuren, insbesondere mit mindestens 12 Aminosäuren oder einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure immunisiert wird.

Das Verfahren erfolgt nach dem Fachmann allgemein bekannten Methoden durch Immunisieren eines Säugetiers, beispielsweise eines Kaninchens, mit dem erfindungsgemäßen Polypeptid oder den genannten Teilen davon oder diese(s) kodierende Nukleinsäure(n), gegebenenfalls in Anwesenheit von z. B. inkompletten Freundesches Adjuvant und/oder Aluminiumhydroxidgelen (siehe z. B. Diamond et al. 1981, The New England Journal of Medicine, pp. 1344-1349). Die im Tier aufgrund einer immunologischen Reaktion entstandenen polyklonalen Antikörper lassen sich anschließend nach allgemein bekannten Methoden leicht aus dem Blut isolieren und z. B. über Säulenchromatographie reinigen. Monoklonale Antikörper können beispielsweise nach der bekannten Methode von Winter & Milstein (1991, Nature 349: 293-299) hergestellt werden.

Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül ein erfindungsgemäßes Polypeptid, ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid oder einen erfindungsgemäßen Antikörper, gegebenenfalls zusammen mit einen pharmazeutisch akzeptablen Träger und/oder Hilfsstoff.

Die Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen, z.B. in Form von Arzneimitteln mit einem Gehalt an erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, erfindungsgemäßigem Polypeptid, erfindungsgemäßen Oligonukleotiden oder erfindungsgemäßen Antikörpern bzw. deren Einsatz bei der erfindungsgemäßen Verwendung erfolgt in üblicher Weise anhand geläu-

figer pharmazeutisch-technologischer Verfahren. Hierzu werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, erfindungsgemäßes Polypeptid, erfindungsgemäße Oligonukleotide oder ein erfindungsgemäßer Antikörper mit geeigneten, pharmazeutisch annehmbaren Hilfs- und Trägerstoffen zu den für die verschiedenen Indikationen und Applikationsorten geeigneten Arzneiformen verarbeitet.

Dabei können die Arzneimittel in der Weise hergestellt werden, daß die jeweils erwünschte Freisetzungsrates, z.B. eine rasche Anflutung und/oder ein Retard- bzw. Depoteffekt erzielt werden. Ein Medikament kann dabei eine Salbe, Gel, Pflaster, Emulsion, Lotion, Schaum, Creme oder mischphasigen oder amphiphile Emulsionssysteme (Öl/Wasser-Wasser/Öl-Mischphase), Liposom, Transfersom, Paste oder Puder sein.

Der Begriff "Hilfsstoff" bedeutet erfindungsgemäß jedes, nicht-toxische, feste oder flüssige Füll-, Verdünnungs-, oder Verpackungsmaterial, solange es nicht ungebührnd nachteilhaft mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül, einem erfindungsgemäßen Polypeptid, einem erfindungsgemäßen Oligonukleotid oder einem erfindungsgemäßen Antikörper oder dem Patienten reagiert. Flüssige galenische Hilfsstoffe sind zum Beispiel steriles Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Zuckerlösungen, Ethanol und/oder Öle. Galenische Hilfsstoffe zur Herstellung von Tabletten und Kapseln können zum Beispiel Bindemittel und Füllmaterial enthalten.

Weiterhin kann ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes Polypeptid, ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid und/oder ein erfindungsgemäßer Antikörper in Form von systemisch eingesetzten Arzneimitteln verwendet werden. Dazu gehören die Parenteralia, zu denen die Injektabilia und Infusionen gehören. Injektabilia werden entweder in Form von Ampullen oder auch als sog. gebrauchsfertige Injektabilia, z.B. als Fertigspritzen oder Einmalspritzen, daneben auch in Durchstechflaschen zur mehrmaligen Entnahme hergerichtet. Die Verabreichung der Injektabilia kann in Form der subkutanen (s.c.), intramuskulären (i.m.), intravenösen (i.v.) oder intrakutanen (i.c.) Applikation erfolgen. Insbesondere können die jeweils zweckmäßigen Injektionsformen als Kristallsuspensionen, Lösungen, nanopartikuläre oder kolloiddisperse Systeme, wie z.B. Hydrosole, hergestellt werden.

Die injizierbaren Zubereitungen können ferner als Konzentrate hergestellt werden, die mit wässrigen isotonischen Verdünnungsmitteln aufgelöst oder dispergiert werden. Die Infusio-

nen lassen sich ebenfalls in Form von isotonischen Lösungen, Fettemulsionen, Liposomenzubereitungen, Mikroemulsionen, zubereiten. Wie Injektabilia können auch Infusionszubereitungen in Form von Konzentraten zum Verdünnen zubereitet werden. Die injizierbaren Zubereitungen können auch in Form von Dauerinfusionen sowohl in der stationären als auch in der ambulanten Therapie, z.B. in Form von Minipumpen, appliziert werden.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül, erfindungsgemäße Polypeptid, erfindungsgemäße Oligonukleotid oder ein erfindungsgemäßer Antikörper kann in den Parenteralia an Microcarrier oder Nanopartikel gebunden sein, beispielsweise an feinstverteilte Partikel auf Basis von Poly(meth)acrylaten, Polylactaten, Polyglycolaten, Polyaminsäuren oder Polyetherurethanen. Die parenteralen Zubereitungen können auch als Depotpräparate modifiziert sein, z.B. aufbauend auf dem "Multiple Unit Prinzip", wenn ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes Polypeptid, ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid oder ein erfindungsgemäßer Antikörper in feinst verteilter bzw. dispergierte, suspendierter Form oder als Kristallsuspension eingearbeitet ist oder aufbauend auf dem "Single Unit Prinzip", wenn ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes Polypeptid, ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid oder ein erfindungsgemäßer Antikörper eingeschlossen ist in einer Arzneiform, z.B. ein Tablette oder ein Stäbchen, das anschließend implantiert wird. Häufig bestehen diese Implantate oder Depotarzneimittel bei Single Unit- und Multiple Unit-Arzneiformen aus sogenannten bioabbaubaren Polymeren, wie z.B. Polyester der Milch- und Glykolsäure, Polyetherurethanen, Polyaminosäuren, Poly(meth)acrylaten oder Polysacchariden.

Als Hilfs- und Trägerstoffe bei der Herstellung von Parenteralia kommen Aqua sterilisata, den pH-Wert beeinflussende Substanzen, wie z.B. organische und anorganische Säuren und Basen sowie deren Salze, Puffersubstanzen zur Einstellung des pH-Wertes, Isotonisierungsmittel, wie z.B. Natriumchlorid, Natriumhydrogencarbonat, Glucose und Fructose, Tenside bzw. oberflächenaktive Substanzen und Emulgatoren, wie z.B. Partialfettsäureester des Polyoxyethylensorbitans (Tween®) oder z.B. Fettsäureester des Polyoxyethylens (Cremophor®), fette Öle, wie z.B. Erdnussöl, Sojabohnenöl und Rizinusöl, synthetische Fettsäureester, wie z.B. Ethyloleat, Isopropylmyristat und Neutralöl (Miglyol®), sowie polymere Hilfsstoffe wie z.B. Gelatine, Dextran, Polyvinylpyrrolidon, von die Löslichkeit erhöhenden Zusätzen organischer Lösungsmittel wie z.B. Propylenglycol, Ethanol, N,N-Dimethylacetamid, Propylenglycol oder komplexbildender Stoffe, wie z.B. Citraten und Harnstoff, Konservierungsmittel, wie

z.B. Benzoesäurehydroxypropyl- und -methylester, Benzylalkohol, Antioxidantien, wie z.B. Natriumsulfit und Stabilisatoren, wie z.B. EDTA, in Betracht.

Bei Suspensionen erfolgt ein Zusatz von Verdickungsmitteln zum Verhindern des Absetzens von erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, erfindungsgemäßen Polypeptiden, erfindungsgemäßen Oligonukleotiden oder einem erfindungsgemäßen Antikörper von Tensiden und Peptisatoren, um die Aufschüttelbarkeit des Sediments zu sichern, oder von Komplexbildnern wie EDTA. Es lassen sich auch mit verschiedenen Polymeren Wirkstoffkomplexe erzielen, beispielweise mit Polyethylenglykolen, Polystyrol, Carboxymethylcellulose, Pluronics® oder Polyethylenglykolsorbitfettsäureestern. Zur Herstellung von Lyophilisaten werden Gerüstbildner, wie z.B. Mannit, Dextran, Saccharose, Humanalbumin, Lactose, PVP oder Gelatinesorten verwendet.

Die jeweils geeigneten Arzneiformen lassen sich in Einklang mit dem Fachmann bekannten Rezepturvorschriften und Verfahrensweisen auf der Basis pharmazeutisch-physikalischer Grundlagen herstellen.

Ein letzter Aspekt betrifft die Verabreichung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotide bei der Gentherapie mittels herkömmlicher Transfektionssystem, wie zum Beispiel Liposomen oder "Particle gun"-Techniken oder "Gene gun mit "nackter DNA", wie oben bereits beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einem erfindungsgemäßen Vektor oder einem anderen erfindungsgemäßen Genkonstrukt transfiziert ist. Wirtszellen können sowohl prokaryontische als auch eukaryontische Zellen sein, Beispiele für prokaryontische Wirtszellen sind *E. coli* und für eukaryontische Zellen *Saccharomyces cerevisiae* oder Insektenzellen. Weitere brauchbare Zellen und Organismen sind bereits oben beschrieben.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann eine diagnostische Zusammensetzung, umfassend eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, ein erfindungsgemäßes Polypeptid, ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid oder einen erfindungsgemäßen Antikörper. Die erfindungsgemäße diagnostische Zusammensetzung kann auch als Bestandteil eines diagnostischen Kits der Erfindung vorliegen (siehe unten).

Ein noch weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann ein Verfahren zur Diagnose von tumoralen Erkrankungen, umfassend den Schritt von Bestimmen der Expression von 7a5/Prognostin in einer biologischen Probe aus einem erkrankten Gewebe und Vergleich der Expression mit der Expression von 7a5/Prognostin in einem gesunden Gewebe. Bevorzugt ist das erfindungsgemäße Verfahren, bei dem die Bestimmung der Expression von 7a5/Prognostin eine Hybridisierung, eine PCR, eine "real time" (RT)-PCR, eine Antigen-Antikörper Bindung, einen ELISA, eine optische Proteom-Analyse, eine ein- oder mehrdimensionale Gelelektrophorese, eine massenspektrometrische Analyse, eine Chromatographie, eine Sequenzierung, Methylierungsanalyse, SNP-Bestimmung oder Kombinationen dieser Verfahren umfaßt.

So stellt die vorliegende Erfindung die Etablierung, und Aufwendung des transkriptionellen Expressionsnachweises von 7a5/Prognostin unter Verwendung u.a. der real time RT-PCR zur Verfügung. Beispielhaft wurde die Expressionshöhe von 7a5/Prognostin in der unbekannten Probe (z.B. Tumor-RNA) als Prozent der 7a5/Prognostin-Expression in der kommerziell verfügbaren, humanen Kolonkarzinom-Kalibrator-Zelllinie SW620 ermittelt.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann ein Verfahren zur Diagnose von tumorösen Erkrankungen, wobei die tumoröse Erkrankung metastasierender Kolonkrebs ist. Aus dem oben genannten ergibt sich ein prognostischer Wert der auf den oben genannten Wegen generierten 7a5/Prognostin-Expressionshöhen als klinische Parameter. Es gibt bisher keine Beschreibung von Korrelationen der Expressionen der 7a5/Prognostin-Transkripte mit klinischen Parametern wie Metastasierung und/oder Metastasen-freies bzw. generelles Überleben. So führte in in vitro-Systemen die Transfektion der 7a5/Prognostin-cDNA zu erhöhtem Wachstum und zu gesteigerter Migration von humanen Kolonkarzinomzellen. In in vivo-Experimenten wurden sowohl im subkutanen als auch im orthotopen Tiermodell erhöhte Wachstumscharakteristika der transfizierten Zellklone gemessen. Im orthotopen Modell kam es darüber hinaus zur Bildung von Metastasen in der Leber. Die Korrelation der Expressionen der 7a5/Prognostin-Transkripte insbesondere mit der Prognose für die Fernmetastasierung der Kolonkarzinome war bisher unbekannt und ist überraschend.

Erfindungsgemäß kann eine zu untersuchende biologische Probe aus einer Tumorbiopsie aus Darm, Leber, Lymphknoten, Lunge, Knochen oder Hirn abgeleitet sein. Es sind aber auch andere biologische Proben, wie Speichel, Urin, Blut oder Teile davon möglich.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen, umfassend eine Modulation der Expression von 7a5/Prognostin. Die Erfindung betrifft die Korrelation der (u.a. transkriptionellen) Expressionshöhe von 7a5/Prognostin mit der Organspezifität der Metastasierung, sowie der Fernmetastasierungswahrscheinlichkeit von u.a. Kolonkarzinomen. Damit ist die potentielle Nutzung dieses neuen Gens als Markergen für Tumordiagnostik und, darüber hinaus, als Interventionsstarget auch für Tumorthherapie zur Beeinflussung (Verhinderung) der Fernmetastasierung beim u.a. Kolonkarzinom gegeben. Erfindungsgemäß kann eine Beeinflussung zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen die Verabreichung einer erfindungsgemäßen wie oben angegebenen pharmazeutischen Zusammensetzung umfassen. Ein weiterer besonderer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen, wobei die tumoröse Erkrankung metastasierender Kolonkrebs ist.

Die Identifizierung der Rolle von 7a5/Prognostin bei der Metastasierung in tumorösen Erkrankungen stellt in einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung die Möglichkeit der Verwendung von 7a5/Prognostin als ein "Target" für ein Verfahren zur Auffindung von Substanzen, die an 7a5/Prognostin binden, zur Verfügung. Erfindungsgemäß umfaßt dieses Verfahren ein in Kontakt bringen einer Zelle, die 7a5/Prognostin exprimiert (zum Beispiel einer rekombinanten Zelle wie oben) mit einer Kandidaten-Substanz, Nachweisen der Anwesenheit der Kandidaten-Substanz, die an 7a5/Prognostin bindet, und Bestimmen, ob die Kandidaten-Substanz auch an 7a5/Prognostin bindet. Verfahren zur routinemäßigen Durchführung solcher Screenings sind dem Fachmann im Stand der Technik der Pharmazie gut bekannt. Mittels "High-Throughput-Technologien" können geeignete Substanzbibliotheken durchsucht werden. Diese Bibliotheken und ihre Durchsuchung sind dem Fachmann bekannt und leicht an die Gegebenheiten der vorliegenden Erfindung anzupassen, ohne dabei erfinderisch tätig sein zu müssen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend die Schritte des oben genannten Scree-

ning-Verfahrens und geeignetes Formulieren der in Schritt c) identifizierten Substanz in eine pharmazeutisch akzeptable Form.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, eines erfindungsgemäßen Polypeptids, eines erfindungsgemäßen Oligonukleotids oder eines erfindungsgemäßen Antikörpers zur Diagnose und/oder zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen. Dazu sind oben Aspekte bereits ausgeführt. Weiter kann anhand von Untersuchungen der Expressionsveränderungen des 7a5/Prognostins eines Patienten auch die Pharmakokinetik des verwendeten Therapeutikums zur Behandlung bestimmt werden, und so die Parameter der Behandlung geeignet modifiziert werden (wobei auch andere bekannte Parameter dem Fachmann bekannt sind). Dieser Aspekt ist ebenfalls als "personalized medicine" bekannt. Des weiteren können auch Linker für die bildgebende Diagnostik oder Therapie an erfindungsgemäße Gegenstände angebracht werden (molekulares Imaging, gerichtete Therapie). Diese Linker sind dem Fachmann bekannt, z.B. aus Trail PA, King HD, Dubowchik GM. Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer. Cancer Immunol Immunother. 2003 May;52(5):328-37. Epub 2003 Jan 16.; Signore A, Annovazzi A, Chianelli M, Corsetti F, Van de Wiele C, Watherhouse RN. Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy. Eur J Nucl Med. 2001 Oct;28(10):1555-65. Epub 2001 Jul 31. Erratum in: Eur J Nucl Med 2001 Nov;28(11):1737.; und Mehvar R. Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. J Control Release. 2000 Oct 3;69(1):1-25.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft dann die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz als Marker für humane Erbkrankheiten. Dazu wird die Sequenz des 7a5/Prognostins auf spezifische Mutationen (z.B. SNPs oder andere Punktmutationen) hin untersucht, die dann unterschiedliche Präferenzen für eine Metastasierung bewirken könnten. Auch kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder erfindungsgemäßes Oligonukleotid zur Gentherapie verwendet werden. Aspekte dazu sind bereits oben ausgeführt und schließen siRNA und/oder antisense-Techniken ein.

Zuletzt umfaßt die vorliegende Erfindung auch einen diagnostischen Kit, der eine diagnostische Zusammensetzung wie oben ausgeführt, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Puffern und/oder Gebrauchsanweisungen umfaßt. In einer Ausführungsform liegt der erfindungsgemäße diagnostische Kit in Form eines PCR-, insbesondere RT-PCR-, oder ELISA-Kits vor.

Ein Beispiel eines solchen Kits für die Echtzeit ("real time") RT-PCR wäre z.B. mit den durch die Erfinder designten Primern und Sonden für den transkriptionellen Expressionsnachweis von 7a5/Prognostin zusammen mit allen Agenzien für die real time RT-PCR. Darüber hinaus wurde durch die Erfinder ein reproduzierbares und einfach handhabbares Arbeitsprotokoll erstellt. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Einbeziehung von 7a5/Prognostin (unter Anwendung aller Technik-üblichen Kontrollen) in die DNA-Chip-Technologie; sowohl in DNA-Chips, die, jeweils aktualisiert, "alle" bekannten Gene erfassen, als auch insbesondere in solche, die Themen-relevant spezifische Gene z.B. definierter Tumorentitäten, Signaltransduktionskaskaden etc. beinhalten.

Die Verwendung des Nachweises der Expression des hier beschriebenen, neu identifizierten Gens 7a5/Prognostin im Primärtumor von Kolonkarzinom-Patienten ist unter anderem mit der Fernmetastasierung (z.B. in Leber und Lunge) korreliert. Die Erfinder haben durch vergleichende Expressionsanalyse in humanen Primärtumoren, Metastasen unterschiedlicher Zielorgane und in den korrespondierenden Normalgeweben von Kolonkarzinom-Patienten das neue Gen 7a5/Prognostin identifiziert. Es ist auf Chromosom 7 des humanen Genoms lokalisiert.

Die transkriptionelle Expression von 7a5/Prognostin ist überraschenderweise a) in malignen Geweben (Primärtumoren, Metastasen) höher als in den korrespondierenden Normalgeweben, b) in den Fernmetastasen der Kolonkarzinome, z.B. in Leber und Lunge, höher als im korrespondierenden Primärtumor, c) vor allem höher in den Primärtumoren, die bereits metastasiert haben oder im Verlauf der Erkrankung noch manifest metastasieren werden, im Vergleich zu den Primärtumoren, die nicht metastasieren.

Da die hier vorgestellte Erfindung eines Verfahrens zur Fernmetastasierungsprognose für Kolonkarzinom-Patienten basierend auf dem transkriptionellen Nachweis des neuen Gens 7a5/Prognostin eine zentrale klinische Frage berührt, kann ein Interesse an dieser Erfindung ohne Einschränkung für alle onkologischen Kliniken und Forschungsinstitute weltweit gelten.

Insbesondere stellt die Erfindung folgende Vorteile zur Verfügung

- a) die Sequenz der neu identifizierten 7a5/Prognostin-cDNA sowie der putativen Proteinsequenz, wobei charakteristische Interaktionsdomänen markiert sind (Figur 3).
- b) in *in vitro*-Systemen führte die Transfektion der 7a5/Prognostin-cDNA zu erhöhtem Wachstum und zu gesteigerter Migration der humanen Kolonkarzinomzellen.

- c) in *in vivo*-Experimenten wurden sowohl im subkutanen als auch im orthotopen Tiermodell erhöhte Wachstumscharakteristika der transfizierten Zellklone gemessen. Im orthotopen Modell kam es darüber hinaus zur Bildung von Metastasen in der Leber.
- d) Messung der relativen 7a5/Prognostin-mRNA-Expression in Primärtumoren, Metastasen sowie korrespondierenden Normalgeweben in Patienten mit Kolonkarzinomen.
- e) Messung der relativen 7a5/Prognostin-mRNA-Expression in Primärtumoren von Patienten mit Kolonkarzinomen.

Da sich die Verwendung der real time RT-PCR zunehmend zur "state of the art"-Methode der transkriptionellen Expressionsanalytik entwickelt, können die apparativen Voraussetzungen zur Anwendung der Erfindung zunehmend in den Laboratorien weltweit vorausgesetzt werden.

Die Erfindung soll nun im folgenden unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren und Sequenzen weiter beispielhaft erläutert werden, in denen

Figur 1 die relative 7a5/Prognostin-mRNA-Expression in Primärtumoren von Patienten mit Kolonkarzinomen das Metastasen-freies Überleben zeigt,

Figur 2 die relative 7a5/Prognostin-mRNA-Expression in Primärtumoren von Patienten mit Kolonkarzinomen die Entwicklung von Metastasen zeigt,

Figur 3 die Sequenz der neu identifizierten 7a5/Prognostin-cDNA sowie der putativen Proteinsequenz zeigt; charakteristische Interaktionsdomänen sind markiert,

Figur 4 die 7a5/Prognostin-Expression in Primärtumoren von Kolonkarzinom-Patienten, gruppiert nach Metastasierung und Metastasierungszeitpunkt, zeigt,

Figur 5 das Metastasen-freies Überleben vom Kolonkarzinom-Patienten mit niedriger (≤ 240) und hoher (> 240) 7a5/Prognostin-Expression in Primärtumoren zeigt, und

Figur 6 den inhibitorischen Einfluß von 7a5/Prognostin-spezifischer siRNA auf die Expression von 7a5/Prognostin (A) und den inhibitorischen Einfluß von 7a5/Prognostin-spezifischer siRNA auf das Migrationsverhalten von Kolonkarzinomzellen (B) zeigt,

SEQ ID No. 1: die cDNA Sequenz von 7a5/Prognostin zeigt,
SEQ ID No. 2: die Proteinsequenz von 7a5/Prognostin zeigt,
SEQ ID No. 3 bis SEQ ID No. 6: in den Beispielen verwendete Oligonukleotide, und
SEQ ID No. 7: ein beispielhaftes siRNA-Molekül aus den Beispielen zeigt.

Beispiele

Metastasierungsprognose unter Verwendung des 7a5/Prognostin-mRNA-Expressionsniveaus (real time RT-PCR)

Patienten und menschliche Gewebe

71 Patienten traten in diese Studie ein, die mit informierter Zustimmung der Patienten durchgeführt wurde. Die Mensch-primären Kolontumore (46 Proben von 44 Patienten), Metastasen (52 Proben von 41 Patienten) und normalen Geweben (37 Mucosaproben, 18 Lebergewebe, 1 Lungengewebe, und 1 Lymphknoten; von 40 Patienten) wurden in flüssigem Stickstoff perioperativ schockgefroren und bei -80°C für weitere Analysen in der Tumor Bank der Robert-Rössle-Klinik, Berlin gelagert. Der TNM Status wurde durch Pathologen der Robert-Rössle-Klinik bestimmt.

Mikrodissektion und RNA Isolierung

Serielle Kryoschnitte jedes Gewebes wurden für die RNA Isolierung (10µm) und Immunohistochemie (5µm) hergestellt. Für die Mikrodissektion von Tumour-Zellpopulationen, wurde jeder zehnte Kryoschnitt pro Gewebe durch einen Pathologen nach Färbung mit Hämalaun evaluiert. Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde aus Mikrodissektions-Zellpopulationen, unter der Verwendung eines DNase Inkubations-Schrittes (High Pure RNA Tissue Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE) durchgeführt. Die RNA Konzentrationen wurden im Microplatten Fluoreszenz-Lesegerät (RiboGreen RNA Quantitation Kit, Molecular Probes via MoBiTec, Göttingen, DE) gemessen und wurden in zweifachen Ansätzen aus den ribosomalen RNA-Eichkurven (EasySoftG200/Easy-Fit Software, SLT-Labinstruments, Crailsheim, DE) berechnet. Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Tumorzelllinien wurde unter der Verwendung von Trizol Reagenz (Invitrogen) durchgeführt.

Differential Display RT-PCR

Differential Display RT-PCR wurde unter der Verwendung des RNAimage Differential Display Systems 3 (GenHunter Corp., Nashville, TN) durchgeführt. Jeder der drei zur Verfügung gestellten eine Base-verankerten Primer wurde für die reverse Transkription von 200 ng von Gesamt-RNA pro Reaktion verwendet, gemäß den Anweisungen des Herstellers. Differential display PCR wurde unter Befolgung des empfohlenen Protokolls durchgeführt, wobei α -[³³P]dATP (NEN Life Science, Zaventum, Belgium) als Marker und AmpliTaq Polymerase (Applied Biosystems, Weiterstadt, DE) verwendet wurden. Die PCR-Produkte wurden in einem 5% Polyacrylamidgel getrennt. Das Gel wurde geblottet, getrocknet und über Nacht gegenüber Röntgenfilm ausgesetzt (Kodak BioMax MR, via Sigma, Deisenhofen, DE). Der Film wurde wieder an das Gel angepaßt, um ein Ausschneiden der Banden zu ermöglichen, die verschiedene Expression zeigten. Diese cDNA-Fragmente wurden durch PCR unter der Verwendung derselben Primerkombinationen und PCR Bedingungen wie für differential Display RT-PCR reamplifiziert, und in den pCR2.1 Vektor (was zu den hier beschriebenen Konstrukten führte: pCR2.1/7a3, pCR2.1/7a5, pCR2.1/7a10, Original TA Cloning Kit, Invitrogen) kloniert.

Überprüfung von cDNA Fragment-enthaltenden Konstrukten

Die pCR2.1 Konstrukte (hier beschrieben: pCR2.1/7a3, pCR2.1/7a5, pCR2.1/7a10) wurden unter der Verwendung eines Minifold II Slotblot Apparates (Schleicher & Schuell, Dassel, DE) jedes auf fünf Nylonmembranen unter der Verwendung eines Minifold II Slotblot Apparates (Schleicher & Schuell, Dassel, DE) geblottet. Jede Membran wurde mit vollständigen differential Display RT-PCR Produkten, die aus einem spezifischen Gewebetyp erzeugt wurden (Consalez et al. 1996), hybridisiert. Um eine hohe spezifische Aktivität zu erreichen, wurden die differential Display RT-PCR Produkte mit α -[³²P]dCTP (NEN) neu markiert (Random Primed Labeling Kit, Roche Diagnostics), und wurden gereinigt (Nucleotide Removal Kit, QIAGEN, Hilden, DE). Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 65°C (6x SSC, 5x Denhardt's Reagenz, 0.5% SDS, 100µg/ml gescherter DNA) durchgeführt. Die Blots wurden gegenüber Röntgenfilm ausgesetzt (Kodak Xomat-AR). Die Inserts von Konstrukten die ein ähnliches Expressionsmuster zeigten, wie es in der differential Display RT-PCR gefunden wurde, wurden sequenziert (Invitak, Berlin, DE).

cDNA Bibliotheks-Screening

Die SW480 Zelllinien-abgeleitete menschliche kolorektale Adenocarcinom STRETCH PLUS cDNA library (Clontech, Heidelberg, DE) wurde in den bakteriellen Wirtsstamm Y1090 r⁻ transfiziert. Zweifache Filter-Replika wurden unter der Verwendung von Optitran verstärkte Cellulosenitrat Membranen (Schleicher & Schuell) erzeugt. Die Filter wurden denaturiert (0.5N NaOH, 1M NaCl) und neutralisiert (0.5M Tris pH 8, 1M NaCl). Das Konstrukt pCR2.1/7a5 wurde mit α -[³²P]dCTP (NEN) unter der Verwendung des Random Primed Labeling Kit (Roche Diagnostics) markiert als Sonde verwendet. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 65°C (5x SSC, 5x Denhardt's Reagenz, 0.1% SDS, 100µg/ml gescherte DNA) durchgeführt. Die Filter wurden dann gegenüber Röntgenfilm exponiert (Kodak Xomat-AR). Positive Plaques wurden gepickt. Die DNA Präparation wurde unter der Verwendung des Lambda-DNA Präparations Kit (QIAGEN) durchgeführt. Die cDNA Inserts wurden sequenziert (Invitak).

Verlängerung der Sequenzinformation

Durch differential Display RT-PCR und cDNA library Screening erhaltene Sequenzen wurden für die Datenbankanalysen verwendet, die alle unter der Verwendung des WWW²HUSAR Analyse Pakets auf dem Server der Biocomputing Service Gruppe des DKFZ in Heidelberg (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de>). Ein EST Cluster wurde bestimmt, der Sequenzidentität zeigte, lokalisiert auf dem genomischen DNA Sequenzfragment AC007001. In der 5'-Richtung wurden drei weitere EST Cluster lokalisiert. EST-verbindende RT-PCR wurde durchgeführt (GeneAmp RNA PCR Kit, Applied Biosystems) um zu überprüfen, ob die identifizierten EST Cluster Teil der 7a5-cDNA sind. Unter der Verwendung der neuen Sequenzinformation und der cDNA Sequenz von SH3BP4, die Sequenzähnlichkeiten in überlappenden Regionen zeigte, wurden EST Cluster identifiziert, die auf dem genomischen DNA Sequenzfragment AC005083 lokalisiert waren. Long-distance RT-PCR (reverse Transkription: Expand Reverse Transkriptase; PCR: Expand High Fidelity PCR, beide Roche Diagnostics) wurde durchgeführt um zu überprüfen, ob die identifizierten ESTs Teile der 7a5-cDNA waren.

5'-RACE

5'-RACE wurde durchgeführt, wobei der SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet wurde. Agarosegel-getrennte PCR

Produkte wurden re-amplifiziert und in den pCR2.1 Vektor (Invitrogen) für die Sequenzierung kloniert.

Klonierung des ORF in einen Expressionsvektor

Long distance RT-PCR wurde wie oben durchgeführt, wobei jedoch Primer für die Amplifikation des gesamten ORF ohne Stopcodon verwendet wurden. Der Primer am 5'-Ende war so aufgebaut, um eine gerichtete Klonierung des ORF in den pcDNA3.1D/V5-His-TOPO Vektor (pcDNA3.1Directional TOPO Expression Kit, Invitrogen), im Hinblick auf den richtigen Rahmen zu ermöglichen. Das Klonierungsverfahren wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Konstrukte (pcDNA3.1D/7a5-V5-His), die das erwartete Insert enthielten, wurden sequenziert.

Erzeugung von stabil transduzierten 7a5 exprimierenden SW480 Zellklonen

Um die biologische Funktion des 7a5 Gens zu analysieren, wurden das 7a5- exprimierende pcDNA3.1D/7a5-V5-His Konstrukt und das LacZ-exprimierende pcDNA3.1D/V5-His/lacZ Konstrukt (Invitrogen, diente als Kontrolle) in SW480 Zellen unter der Verwendung von Lipofectin (Invitrogen) gemäß den Anweisungen des Herstellers transduziert. Für die Transduktion, wurden 10µg Plasmid DNA und 15µl Lipofectin verwendet, um 5×10^4 Zellen zu transduzieren. 48h nach Transduktion wurden Konstrukt-tragende Klone in G418 (Invitrogen) enthaltendem Medium selektiert. Nach zwei Wochen waren Kolonien sichtbar, die dann für weitere Experimente ring-kloniert und expandiert wurden. Alle isolierten Zellklone wurden durch Western Blots und real time RT-PCR auf 7a5 oder LacZ Expression gescreent.

Western Blots von 7a5-exprimierenden SW480 Zellklonen

7a5-transduzierte, lacZ- transduzierte und Wildtyp SW480 Zellen wurden in 1% SDS, 10mM Tris-HCl, 2mM EDTA lysiert und in einem 7.5% Polyacrylamidgel getrennt. Nach Elektrophoretik (1 h, Trans Blot - Semi Dry Transfer Cell, BioRad, Munich, DE) wurde exprimiertes 7a5 Protein unter der Verwendung eines anti-V5 Antikörpers (Invitrogen) und einem sekundären anti-Maus-HRP Antikörper (Promega, Madison, WI) nachgewiesen. Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde mit ECL Lösung (Amersham Biosciences, Freiburg, DE) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt

Relative quantitative zwei-Schritt real time RT-PCR

Reverse Transkriptase Reaktion (RT) wurde mit 50 ng an Gesamt-RNA (MuLV Reverse Transkriptase, Applied Biosystems) durchgeführt. Für jede quantitative real time PCR (95°C für 60 Sekunden, 45 Zyklen von 95°C 10 Sekunden, 60°C 10 Sekunden, 72°C 20 Sekunden), wurde 1/5 des RT Volumens unter Verwendung des LightCycler (LightCycler DNA Master Hybridization Probes kit, Roche Diagnostics) genommen. Die Expression von 7a5 und des Haus-keeping-Gens Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) wurden in zweifachen Ansätzen aus der selben RT-Reaktion bestimmt. Für 7a5 wurde ein 136 bp Amplikon und für G6PDH ein 136 bp Amplikon durch Primer hergestellt, die durch Gen-spezifische Fluoreszin- und LCR640-markiert Hybridisierungssonden (Synthese von Primern und Sonden: BioTeZ und TIB MolBiol, beide Berlin, DE) erkannt wurden. Die Kalibrator cDNA wurde in seriellen Verdünnungen gleichzeitig in jedem Lauf verwendet, abgeleitet von der Zelllinie SW620.

Zum Nachweis von menschlichen Zellen SW620 Klontumoren in Mausleber nach orthotoper Transplantation wurde eine menschliche Satelliten Sequenz verwendet. Primer (Synthese BioTeZ, Berlin), die ein Amplikon erzeugten, wurden verwendet (ähnlich zu Becker et al., 2002) (Synthese TIB MolBiol, Berlin). Real time PCR wurde wie oben beschrieben unter der Verwendung von 250 ng der genomischen DNA durchgeführt.

Primer:

vorwärts: 5' - ttc ttt tga ttc ctc cgg tga - 3' (SEQ ID No. 3)

reverse: 5' - act ctg atg ggc atg tgc tg - 3' (SEQ ID No. 4)

Sonden (hier für Anwendung am Light Cycler):

5'- gca gac ttc ctc aag aaa ttc tgg aag atc ta - 3' – FITC (SEQ ID No. 5)

LCRed - 5'- agt gtt tca gaa ctt ctg gac att tta gac ga – 3' (SEQ ID No. 6)

Annealing-Temperatur: 60°C; Zyklenanzahl: 45

Soft Agar Wachstum von 7a5 transduzierten SW480 Tumorzellklonen

Zur Evaluierung von Zellwachstum in Soft Agar, wurden 5 ml von auf 50°C vorgewärmtem 1% Agar (Difco, Detroit, MI) mit 5 ml DMEM Medium gemischt (doppelt konzentriert w/o Phenolrot, Invitrogen), ergänzt mit 10% FCS und Antibiotika. 200µl Zellsuspension, die 5x 10⁴ Zellen enthielt wurden schnell zu den 10ml von Soft Agar Gemisch hinzugefügt, kräftig gemischt, in 5ml Aliquots in 60 mm Petrischalen gegossen und für 5 Minuten auf Eis plaziert.

Dann wurden die 7a5-transduzierten Zellklone, die lacZ- transduzierten Zellklone und Wildtyp SW480 Zellen wurden in zweifachen Ansätzen in Soft Agar für 8 Tage angezogen und Kolonien wurden gezählt.

Zellmigrations-Test

Transwell Membrankammern (Porengröße 12,0 µm, Costar, Heidelberg, DE) wurden mit 1ml RPMI 1640 Medium equilibriert, das mit 10% FCS für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ ergänzt war. Dann wurde das Medium entfernt und 0,5ml Zellsuspension, die $2,5 \times 10^5$ Zellen enthielt wurde zu den Filter-Membrankammern hinzugefügt und 1,5 ml Medium wurden zu der unteren Kammer hinzugefügt. Die Zahl von Zellen, die durch die Membran zu der unteren Kammer wanderten wurde gezählt nach 24 h nach Zellinokulation (in dreifachen Ansätzen durchgeführt).

In vivo Wachstum von 7a5 transduzierten SW480 Zellklonen: subkutane Transplantation

Für *in vivo* Tumorwachstum wurden 1×10^7 7a5-transduzierte, LacZ-transduzierte oder Wildtyp SW480 Zellen subkutan entlang der linken Flanke von 6 - 8 Wochen alten männlichen NMRI nu/nu Mäusen an Tag 0 transplantiert. Jede Tiergruppe bestand aus 10 Tieren. Die Tiere wurden für 39 Tage gehalten, um die Entwicklung von meßbaren Tumoren zu ermöglichen. Die Tumorgröße wurde in allen Gruppen in zwei Dimensionen an Tagen 7, 11, 15, 21, 27, 32, 35 und 39 gemessen. Die Tumor-Volumen wurden berechnet ($\text{Breite}^2 \times \text{Länge}$)/2 und als mittleres Tumor-Volumen in cm³ angegeben. Die Tiere wurden getötet und Tumore wurden entfernt und in flüssigem Stickstoff für weitere Analysen schockgefroren.

In vivo Wachstum von 7a5 transduzierten SW480 Zellklonen: orthotope Transplantation

1×10^7 7a5- transduzierte, LacZ- transduzierte oder Wildtyp SW480 Zellen wurden zuerst subkutan entlang der linken Flanke von 6 - 8 Wochen alten weiblichen SCID-beige Mäusen transplantiert, und für drei Wochen wachsen gelassen. Dann wurden diese Tumore entnommen, in $2 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$ große Stücke geschnitten und wurden orthotop in das Caecum von weiblichen SCID-beigen Mäusen transplantiert. Jede Tiergruppe bestand aus 5 Tieren. Die Tiere wurden für 70 Tage gehalten, um Tumorwachstum und Metastasierung zu ermöglichen. Beginnend am Tag 16, wurde die Tumorgröße in allen Gruppen einmal die Woche gemessen. Die Tiere wurden getötet und Tumore sowie potentiell metastatische Organe wurden entfernt

und in flüssigem Stickstoff für weitere Analysen schock-gefroren. Nach der Entnahme wurden die finalen Tumervolumen Länge x Breite x Höhe berechnet und als mittleres Tumorumfangen in cm^3 angegeben.

***In situ* Hybridisierung in menschlichem Gewebe**

Das 7a5-spezifische differential Display RT-PCR Fragment wurde via pCR2.1/7a5 für Klonierung in den pBluescript II SK+ Vektor (Stratagene GmbH, Heidelberg, DE) übertragen. Die *in vitro* Transkription wurde unter der Verwendung von T7 und SP6 RNA Polymerasen (Epicentre Technologies, Madison, Sonden durchgeführt, WI) um sense und antisense Sonden zu erhalten. Die Transkription wurde unter der Verwendung des DIG Labeling Kit (Roche Diagnostics) durchgeführt.

Kryoschnitte von menschlichem Gewebe wurden in Paraformaldehyd fixiert und getrocknet. Die Prähybridisierung wurde für eine Stunde bei 55°C unter der Verwendung von 4x SSC, 5% Dextransulfat, 1x Denhardt's Reagenz, 50% Formamid, 0,25mg/ml Hefe-tRNA und 0,5mg/ml fragmentierter Lachssperma DNA durchgeführt. Die Hybridisierungsreaktion wurde für 16 Stunden bei 55 °C, unter der Verwendung der Prähybridisierungslösung durchgeführt, die 500 ng/ml der *in vitro*-transkribierten RNA Sonde enthielt. Extensives Waschen wurde in 2x SSC, 50% Formamid bei 55°C durchgeführt. Blocking wurde unter der Verwendung von Blocking Reagenz (Roche Diagnostics) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Schnitte wurden für zwei Stunden mit Anti-DIG-AP Fab Fragmenten (Roche Diagnostics) inkubiert. Nach Waschen wurde ein kolorimetrischer Nachweis unter der Verwendung von NBT/BCIP Lösung (Roche Diagnostics) durch Inkubation im Dunklen durchgeführt.

Immunohistochemie

Kryoschnitte von primären Tumoren, Lymphknoten, Lungen- und Leber-Metastasen sowie aus normalen entsprechenden Geweben wurden gemäß einer Modifikation der DAKO Katalysierten Signal Amplifikation (CSA) System (DAKO A/S, Glostrup, Denmark) immungefärbt: Endogene Biotin Reaktivität wurde mittels einer UVC-Bestrahlung bei 254 nm für 35 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Schnitte wurden in einer wässrigen 0,01% NaN_3 Stabilisator-Lösung für 30 Minuten bei 50°C rehydriert. Endogene Peroxidase wurde durch Inkubation mit 3% H_2O_2 in Methanol für 30 Minuten bei 50°C blockiert. Der Protein Block wurde für 5 Minuten wie empfohlen durchgeführt.

Der primäre polyklonale Kaninchen-anti-Mensch 7a5 Antikörper wurde gegen ein 7a5-derived Polypeptid (AA 812 – 826 nahe dem C-Terminus lokalisiert: (KLH)-SALDRMKNPVTKHWR, Eurogentec, Seraing, Belgium) erzeugt und wurde anschließend durch Affinitäts-Chromatographie auf dem Peptidantigen, gekoppelt an CNBr-Sepharose (BioGenes, Berlin, DE), gereinigt. Dieser Antikörper wurde für die Immunohistochemie in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet. Um die nicht-spezifische Antikörper-basierte Fc-Rezeptorligation zu vermeiden, wurde ein Fc-depletierter biotinylierter affini-reiner F(ab')₂ Fragment-Antikörper mit anti-Kaninchen Spezifität (Verdünnung 1:40.000, Dianova-Jackson ImmunoResearch, Hamburg, DE) verwendet. Die Streptavidin-HRP wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur angewendet. Kolorimetrischer Nachweis wurde unter der Verwendung von DAB Substrat durchgeführt, wobei dem Protokoll des Hersteller gefolgt wurde. Nuclei wurden mit Hämatoxylin für 1 Minute gegengefärbt. Die Schnitte wurden gemäß topographischer Expressionsaspekte analysiert.

Statistische Analyse

Das Ausmaß an statistischer Signifikanz wurde unter der Verwendung des nicht-parametrischen zwei-seitigen Mann-Whitney Rank Sum Tests (real-time RT-PCR) berechnet, und dem zwei-unabhängige Proben T-Test (Soft Agar Wachstum, Zellmigrationstest, in vivo Wachstum).

Diagnose auf Basis von 7a5/Prognostin-Expression in Primärtumoren von Kolonkarzinom-Patienten mit und ohne Metastasierung

Abbildung 4 (Box plot mit Darstellung der Mediane) zeigt die Höhe der 7a5/Prognostin-Expression in den Primärtumoren von Kolonkarzinom-Patienten (T₂₋₄N₀₋₁),

- a) die zum Zeitpunkt der 7a5-Analyse nicht metastasiert waren und im Beobachtungszeitraum von 60 Monaten nicht metastasierten = M0 ohne Metastasen im Verlauf,
- b) die zum Zeitpunkt der 7a5-Analyse nicht metastasiert waren, jedoch im Beobachtungszeitraum von 60 Monaten metastasierten = M0 mit Metastasen im Verlauf, und
- c) die zum Zeitpunkt der 7a5-Analyse bereits metastasiert waren = M1

In den Primärtumoren der Patienten, die im Verlauf Metastasen entwickelten und die bereits metastasiert waren, wurden dabei deutlich höhere 7a5/Prognostin-Expressionen gemessen.

Metastasen-freies Überleben von Kolonkarzinom-Patienten in Abhängigkeit von der Höhe der 7a5/Prognostin-Expression

Abbildung 5 (Kaplan-Meier-Kurve) zeigt die Wahrscheinlichkeit für das Metastasen-freie Überleben in Abhängigkeit von niedriger bzw. hoher 7a5/Prognostin-Expression im jeweiligen Primärtumor. Als "cut-off ist der relative 7a5/Prognostin-Wert von 240 kalkuliert, als "niedrig" sind alle relativen 7a5/Prognostin-Werte ≤ 240 definiert und als "hoch" sind alle relativen 7a5/Prognostin-Werte > 240 definiert.

Beispiel 1: Patienten mit 7a5/Prognostin-Expressionen ≤ 240 im Primärtumor entwickeln zu etwa 20-25% Metastasen (im Beobachtungszeitraum).

Beispiel 2: Patienten mit 7a5/Prognostin-Expressionen > 240 im Primärtumor entwickeln zu etwa 75-80% Metastasen (im Beobachtungszeitraum).

Die 7a5/Prognostin-Expression im Primärtumor ist signifikant prädiktiv für die Entwicklung distanter Metastasen ($P=0.0057$).

Therapeutische Intervention mit 7a5/Prognostin-spezifischer siRNA auf Expressions-ebene

Abbildung 6A beschreibt den Einfluß von transient transfizierten, 7a5/Prognostin-spezifischen siRNA-Oligonukleotiden auf die transkriptionelle Expression von 7a5/Prognostin in einem stabil 7a5/Prognostin-transfizierten und stark überexprimierenden Zellklon einer humanen Kolonkarzinom-Zelllinie. Die nicht mit siRNA-behandelte Kontrolle entspricht 100%:

Beispiel für ein wirksames 7a5/Prognostin-spezifisches siRNA-Oligonukleotid:

- nt 2233 bis 2253 der Vollängen cDNA-Sequenz von 7a5/Prognostin
- 5' -AAGCTTGGAAGGCTGGAGG- 3' (SEQ ID No. 7)

Intervention mit 7a5/Prognostin-spezifischer siRNA auf funktioneller Ebene

Abbildung 6B beschreibt den Einfluß von transient transfizierten, 7a5/Prognostin-spezifischen siRNA-Oligonukleotiden auf das Migrationsverhalten eines stabil 7a5/Prognostin-transfizierten und stark überexprimierenden Zellklons einer humanen Kolonkarzinom-Zelllinie. Die nicht mit siRNA-behandelte Kontrolle entspricht 100%. Für das Protokoll des Migrationsassays, siehe oben.

Durch die transiente Transfektion von 7a5/Prognostin-spezifischer siRNA wird die Expression von 7a5/Prognostin inhibiert. Die Konsequenz besteht in der verminderten Migrationsaktivität dieser Zellen als einem biologischen Parameter für das Metastisierungspotenzial. Für die therapeutische Anwendung am Patienten werden die 7a5/Prognostin-spezifischen siRNA-Oligonukletide bevorzugt in entsprechende Plasmide kloniert. So wird eine stabile siRNA-Expression im Primärtumor des Patienten erreicht, die dann zu einer andauernden Inhibierung der 7a5/Prognostin-Expression führt und die Metastasierung vermindern kann.

Patentansprüche

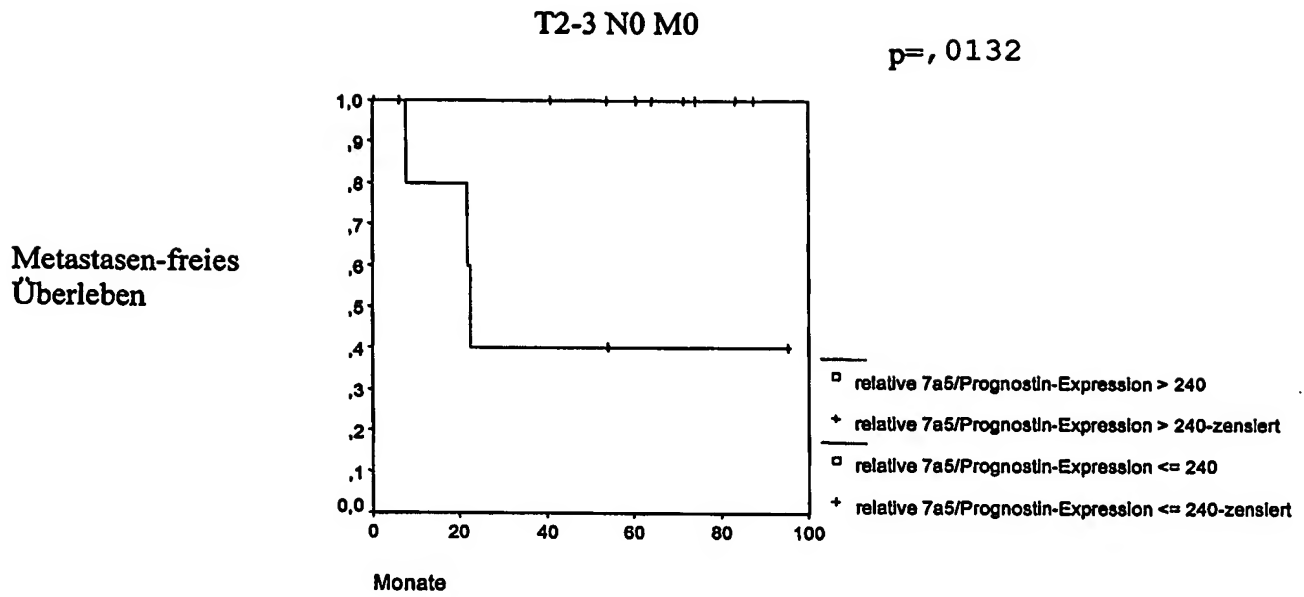
1. Nukleinsäuresequenz, die für das Polypeptid von 7a5/Prognostin kodiert, ausgewählt aus der Gruppe:
 - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID No: 1 angegebenen Sequenz,
 - b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID No: 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz ableiten,
 - c) Derivate der in SEQ ID No: 1 angegebenen Nukleinsäuresequenz, die für die Polypeptide mit der in SEQ ID No: 2 angegebenen Aminosäuresequenz kodieren und mindestens 80% Homologie auf Aminosäureebene aufweisen, ohne daß die biologische Aktivität der Polypeptide wesentlich reduziert ist,
 - d) einer humanen genomischen Nukleinsäuresequenz, welche das Gen für 7a5/Prognostin umfaßt und Polymorphismen aufweist.
2. 7a5/Prognostin-Polypeptid, kodiert durch eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, insbesondere nach SEQ ID No: 2.
3. Oligonukleotid, das spezifisch an eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 hybridisiert, insbesondere gemäß SEQ ID No: 7.
4. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, Polypeptid nach Anspruch 2 oder Oligonukleotid nach Anspruch 3 als Arzneimittel.
5. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1.
6. Rekombinanter prokaryontischer oder eukaryontischer Wirtsorganismus enthaltend mindestens eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder mindestens einen Vektor gemäß Anspruch 5.
7. Polyklonaler oder monoklonaler Antikörper oder Antigen-bindendes Fragment davon, der ein 7a5/Prognostin-Polypeptid, insbesondere nach SEQ ID No: 2, erkennt.

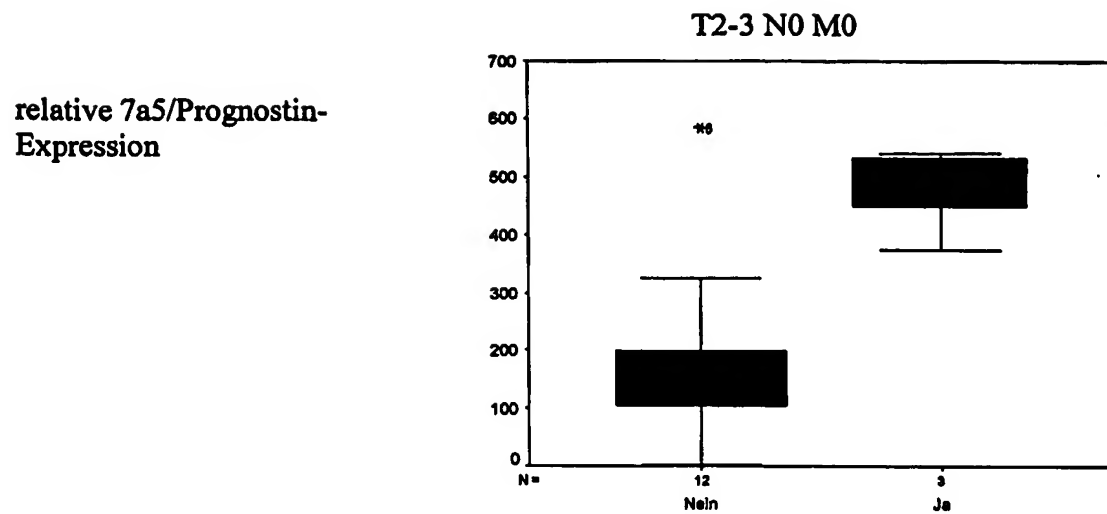
8. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, ein Polypeptid nach Anspruch 2, ein Oligonukleotid nach Anspruch 3 oder einen Antikörper nach Anspruch 7, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch akzeptablen Träger.
9. Diagnostische Zusammensetzung, umfassend eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, ein Polypeptid nach Anspruch 2, ein Oligonukleotid nach Anspruch 3 oder einen Antikörper nach Anspruch 7.
10. Verfahren zur Diagnose von tumoralen Erkrankungen, umfassend den Schritt von Bestimmen der Expression von 7a5/Prognostin in einer biologischen Probe aus einem erkrankten Gewebe oder Körperflüssigkeiten und Vergleich der Expression mit der Expression von 7a5/Prognostin in einem gesunden Gewebe oder Körperflüssigkeit.
11. Verfahren zur Diagnose von tumoralen Erkrankungen nach Anspruch 10, wobei die Bestimmung der Expression von 7a5/Prognostin eine Hybridisierung, eine PCR, eine "real time" (RT)-PCR, eine Antigen-Antikörper Bindung, einen ELISA, eine optische Proteom-Analyse, eine ein- oder mehrdimensionale Gelelektrophorese, eine massenspektrometrische Analyse, eine Chromatographie, eine Sequenzierung, Methylierungsanalyse, SNP-Bestimmung oder Kombinationen dieser Verfahren umfaßt.
12. Verfahren zur Diagnose von tumorösen Erkrankungen nach Anspruch 10 oder 11, wobei die tumoröse Erkrankung metastasierend ist, und insbesondere metastasierender Kolonkrebs ist.
13. Verfahren zur Diagnose von tumoralen Erkrankungen nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei die biologische Probe aus einer Tumorbiopsie aus Darm, Leber, Lymphknoten, Lunge, Knochen oder Hirn oder Körperflüssigkeiten abgeleitet ist.
14. Verfahren zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen, umfassend eine Modulation der Expression von 7a5/Prognostin.
15. Verfahren zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen nach Anspruch 14, umfassend die Verabreichung einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 8.

16. Verfahren zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen nach Anspruch 14 oder 15, wobei die tumoröse Erkrankung metastasierender Kolonkrebs ist.
17. Verfahren zur Auffindung von Substanzen, die an 7a5/Prognostin binden, umfassend
 - a) in Kontakt bringen einer Zelle, die 7a5/Prognostin exprimiert mit einer Kandidaten-Substanz,
 - b) Nachweisen der Anwesenheit der Kandidaten-Substanz, die an 7a5/Prognostin bindet, und
 - c) Bestimmen, ob die Kandidaten-Substanz auch an 7a5/Prognostin bindet.
18. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend die Schritte des Verfahrens nach Anspruch 17 und Formulieren der in Schritt c) identifizierten Substanz in eine pharmazeutisch akzeptable Form.
19. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, eines Polypeptids nach Anspruch 2, eines Oligonukleotids nach Anspruch 3, eines Antikörpers nach Anspruch 7 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 8 zur Behandlung von tumorösen Erkrankungen.
20. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1, eines Polypeptids nach Anspruch 2, eines Oligonukleotids nach Anspruch 3, eines Antikörpers nach Anspruch 7 oder einer diagnostischen Zusammensetzung nach Anspruch 9 zur Diagnose von tumorösen Erkrankungen.
21. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 als Marker für humane Erbkrankheiten.
22. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 oder eines Oligonukleotids nach Anspruch 3 zur Gentherapie.
23. Diagnostischer Kit, umfassend eine diagnostische Zusammensetzung nach Anspruch 9, gegebenenfalls zusammen mit geeigneten Puffern und/oder Gebrauchsanweisungen.

24. Diagnostischer Kit nach Anspruch 23 in Form eines PCR-, insbesondere RT-PCR-, oder ELISA-Kits.

Figur 1



Figur 2

Figur 3

1 ATGCTAATCACTGAAAGAAACATTTTCGGTCAGGAAGAAATTCACAAAGATATCTGGAAGCAAAATTTGATTGACATGGAAGCTGGAAACCTCTCAAAAGTTGCAATATTACAGAAATGC
N L I T E R K H F R S G R I A Q S M S E A N L I D M E A G K L S K S C N I T E C

NPF **NPF**

121 CAGGACCCAGACTTGCTTCACAATTTGGCCGGATGCTTTCACCCCTTCGTGGTAATAATGCTTCCAAAGTTGCAAAATCAATTTGTGGAATCAACTGTCTGCTTTCAACCCATTTTGGATGAC
Q D P D L L H N W P D A F T L R G N N A S K V A N P F W N Q L S A S M P F L D D

241 ATAACCTCACTAAGAAATACAGGAAGAGAAATATATTTCATCTTAAAGGAAGATCCTTTTCTTTCTGTAGAGAAATAGAAAAATGGAATTTCTTTGATTCTCGGTGATGAACCT
I T Q L R N N R K R N N I S I L K E D P F L F C R E I E N G N S F D S S G D E L

361 GATGTGCATCAGTTACTTAGGCAGACTTCTCAAGAAATTCGGAAGATCTAAAGSTVTTTCAGAACTTCTGGACATTTTAGACGACACAGCAGATGCCATCAGAGTATACATAACTCT
D V H Q L L R Q T S S R N S G R S K S V S E L L D I L D D T A H A H Q S I H N S

481 GACCAGATCCTACTACAGACTTAGATGGCTTAAAGATGATCGGGAGGCTTATAAATGGCTTGGTTAAGTCAACGCCAGCTGGCCCGCTCCTGCTTGAATACAATTAGTCAG
D O I L L H D L E W L K N D R E A Y K N A W L S Q R Q L A R S C L D L N T I S Q

601 AGCCCTGGATGGGCCAGACACAACCTTGGGAGGTCAACATAGCTTGCAGAAATCAACATCAAGGAGGGTCAGTACAATTTACCTGAATCAGACATCACTGTTTCATGTGCCCCAAGGTAT
S P W A Q L R Q T S S R N S G R S K S V S E L L D I L D D T A H A H Q S I H N S

721 GTGGCTGTGGGAGAATTCAGAGGTGTCTTAAGGGCTTTCCTGATCGCCACACATGCTTAACCATGATCTTTCGTGCACTGTGAGCCCGTGTGTGGAATCATGTTAGGCAACCTC
V A V G E F Q E V S L R A F L D P P H M L N H D L S C T V S P L L E I H L G N L

841 AATCAATGGAAGCCCTTTTGTGGAGATGAAATTTGGGCTGAAGTAAGAAAGGATCCTTTCAGCCCAAGTATGACAGAAATGGTGTGTTACACAGCTTGGGTAAGAAAGGCCCTTT
N T H E A L L L E H K I G A E V R K D P F S Q V M T E M V C L H S L G K E G P F

961 AAGTTTAAAGCACTGCTACATTTATAAGACACCATCCAAAGTCAAGCTTAATCGACTTGAGTCAGGTAAATGTATCTAGTGGTTGTCGACAAAGTCTTCCGTCACAGCTGACC
K V L S N C Y I Y K D T I Q V K L I D L S Q V H Y L V V A A Q A A K L P S P A A

1081 ACCATTTGGGATTATATCCACAAACACCTCAATTGGAATTTATGGACCCAAATATATCATCCAGTCTTTACTGTTGTTTAAACAGTTTGTGGACACAAATATATGCGCAGGACCTT
T I M D Y I H K T T S I G I Y G P K Y I H P S F T V V L T V C G H N Y L P G Q L

1201 ACAATTTCTGATATTAAAGAGGTGGAAGAAATATCTCCAGTTGTGTTTTCAGCTCTGGGGAGCAGTCAITTTTACTTGACAAGCCACAGATTAAATATTCTATTTTTCCTGT
T I S D I K K G G K N I S P V V F Q L W G K Q S F L L D K P Q D L S I S I F S C

1321 GATCCTGATTTTGAAGTAAGACAGAGGAGAAAGAAATTAACAAAGCAGTGGGAAGCAGGTGAAGTAGTTTCATCAACAAATTTTATTTTCTTGTAGTGACGACAGAGATG
D P D F E V K T E G E R K E I K Q K Q L E A G E V V H Q Q F L S L V E H R E M

1441 CACTTGTGATTTTGTGTTCAAGTGGAGCTCCCAATGGTGAACAGTTGCACAGTCTCTATCACTACTCTGATCCAAACCCAAACCTAAAGAGCTCTGAATCTGCCAGGCTAT
H L F D F C V Q V E P P N G E P V A Q F S I T T P D P T P N L K R L S N L P G Y

PXXP

1561 TTGCAGAAGAGGAGGAATCAAGTCTGCTCTTATCAAGAAATTTCTTTAAATATCTACATTTCAAGATAAAACATTGAACCTTTAGCACTATGAGGTAAACCTGAAAGCAGT
L Q K K E E I K S A P L S K I L V K Y P T F Q D K T L N F S N Y Q V T L K A V

SH3

1681 CTAAACAAGCAAGATTTACTTCTTGAATTTTCAAGCAACATTAAGCTCTCTCTGGGAGGTAAAGTAAAGCTTATGCTCACTCAAACTGAAGAAATGATGAGCA
L R S S K I D Y F L E Y F K G D T I A L L G E G K V K A I G Q S K V K E W Y V Q

1801 GTCTCTAGAGTAAAGTGGACTTGTACACTGCAAAATGTCAGGTGATTTCAAGGAGCAAGTAATGTTTATGTCAGATAGTGTCTTACAAACCAAGAAATCTTCTTGAACAGATTGTC
V L R O K I Q L V H C K N Y K V I S K E Q V M F M S D S V F T T R N L L E Q I V

Y

1921 CTGCTTTAAAAAATGACTTATATCTACTCAGTTGTATTAACTTGGTGTGAGAAAAAGTTTATGATTGGAAGTTTAACTGATGCTTGGGTACTCAGATCTGTCCCTGGAGAT
L P L K K L T Y I Y S V V L T L V S E K V Y D W K V L A D V L G Y S H L S L E D

Y

2041 TTTGATCAAAATTCAGCAGACAAGAACTGAGAAATTTCTTAACTTATAAAGAGTTAAAGGAAGATTGCCACACAGAGAGAAATACAAGGAAGTTTCTGTATGAACCTTATTGTGGCT
F D Q I Q A D K E S E K V S Y V I K K L K E D C H T E R N T R K F L Y E L I V A

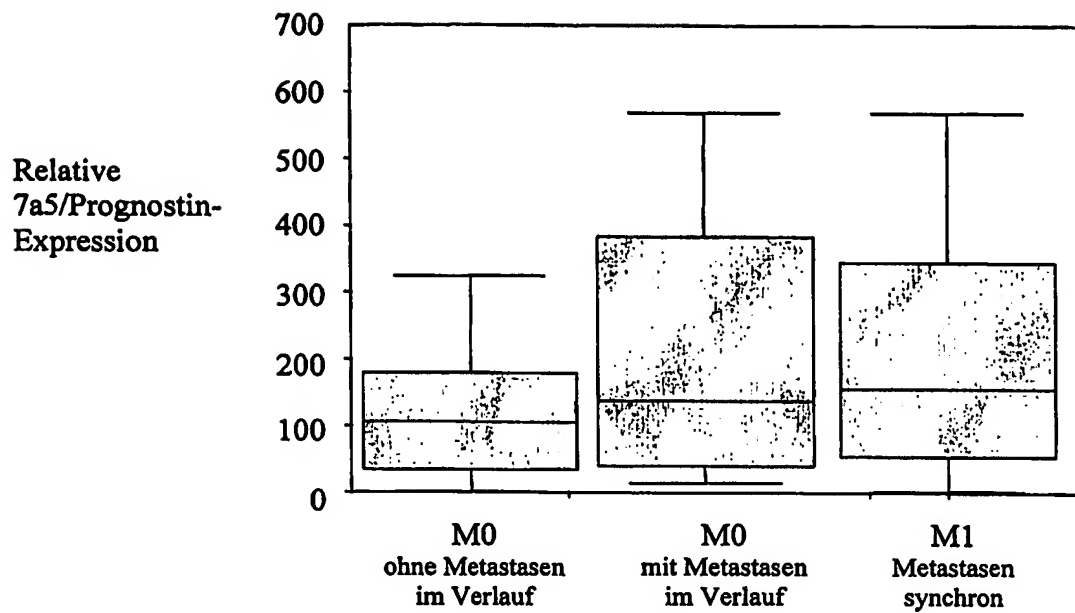
2161 CTCTGAAATGGATTGCCAAGAGTTAGTCGCACGTCTCATCCAGAGCTGCTGTTCTGACTTCAGCTGTCAAGCTTGGAAAGGCTGGAGGGAAGTCTGAAAGTTAGTAGACTC
L L K M D C Q E L V A R L I Q E A A V L T S A V K L G K G W R E L A E K L V R L

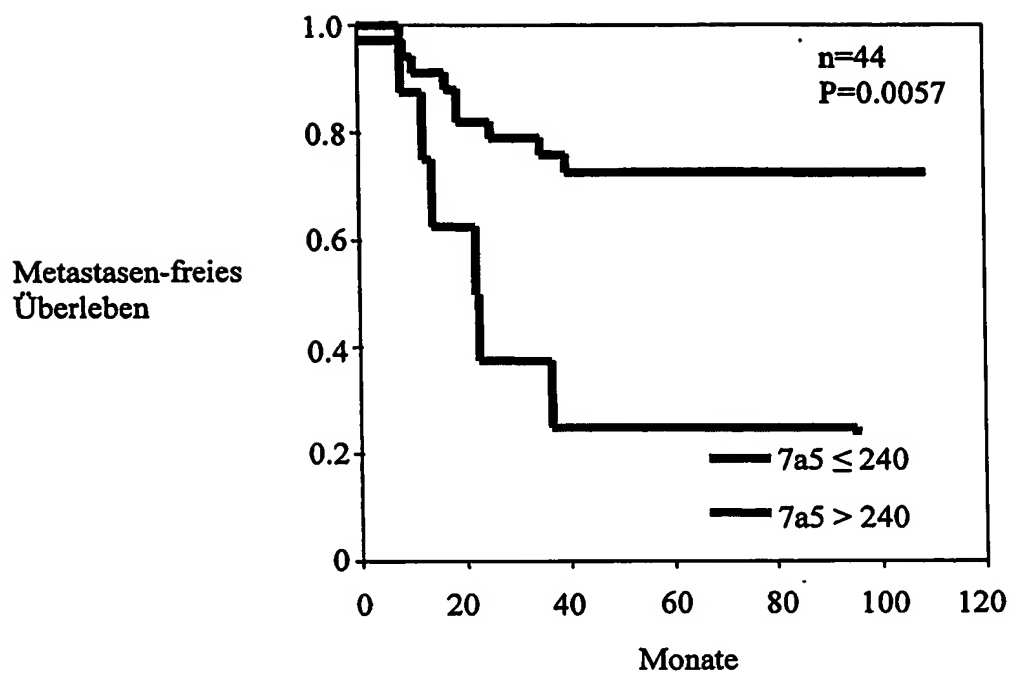
Y

2281 ACAAGCAACAAATGGAGGCATATGAAATTCCTCATCGAGGAAACACTGGAGATGTTGCTGTTGAGATGATGTGGAACCTGCTATGATTTCTGTATACCTGGAGTGTCTCACTATGGA
T K Q Q M E A Y E I P H R G N T G D V A V E M M N K S A Y D F L Y T W S A H Y G

2401 AATAACTACAGAGATGTTTACAAGACCTTCAGTCAGCTTTGGACAGAATGAAAAACCTGTGACTAAACACTGGAGAGAATTAAGTGGAGTTTAACTACTAGTAATTTCTTTGGAGGT
N N Y R D V L Q D L Q S A L D R M K N P V T K H W R E L T G V L I L V N S L E V

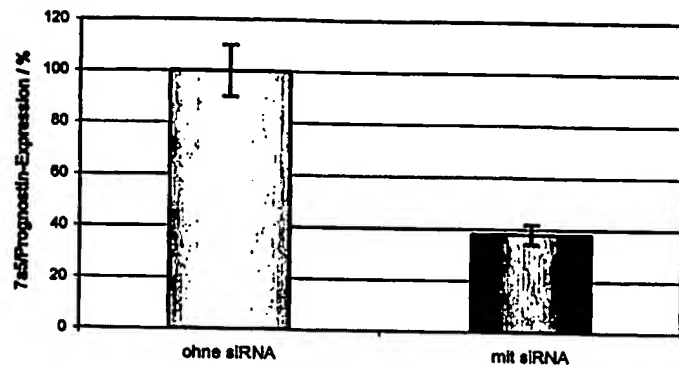
2521 TTGAGAGTAACATCTCTCACTTCTGAGGAAGTATAG
L R V T A F S T S E E V *

Figur 4

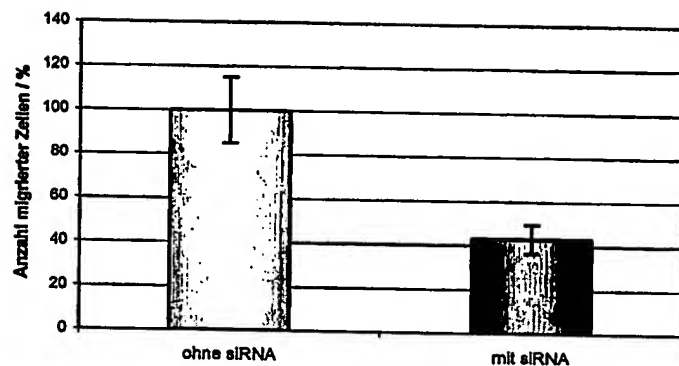
Figur 5

Figur 6

A



B



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Charité - Universitätsmedizin Berlin

<120> 7a5/Prognostin und dessen Verwendung für die Tumordiagnostik und Tumorthherapie

<130> U30057PCT

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 2559

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgctaata ctgaaagaaa acattttcgg tcaggaagaa ttgcacaaag tatgtctgaa      60
gcaaatttga ttgacatgga agctggaaaa ctctcaaaaa gttgcaatat tacagaatgc      120
caggacccag acttgcttca caattggccg gatgctttca cccttcgtgg taataatgct      180
tccaaagttg caaatccatt ctggaatcaa ctgtctgctt ctaaccatt tttggatgac      240
ataactcaac taagaaataa caggaagaga aataatatatt ccatcttaaa ggaagatcct      300
tttcttttct gtagagaaat agaaaatgga aattcttttg attcctccgg tgatgaactt      360
gatgtgcata agttacttag gcagacttcc tcaagaaatt ctggaagatc taaaagtgtt      420
tcagaacttc tggacatttt agacgacaca gcacatgcc atcagagtat acataactct      480
gaccagatcc tactacacga cttagagtgg cttaaaaatg atcgggaggc ttataaaatg      540
gcttggttaa gtcaacgcca gctggcccg tcctgccttg atttgaatac aattagtcag      600
agccctggat gggcccagac acaacttgcg gaggtcacca tagcttgcaa agtaaaccat      660
caaggagggt cagtacaatt acctgaatca gacatcactg ttcattgtgc ccaaggatcat      720
gtggctgtgg gagaattcca agaggtgtct ctaagggtct tccttgatcc gccacacatg      780
cttaaccatg atctttcgtg cactgtgagc ccgttggttg aaatcatgtt aggcaacctc      840
aatacaatgg aagccctttt gctggagatg aaaattgggg ctgaagtaag aaaggatcct      900
ttcagccaag tcatgacaga aatggtgtgt ttacacagct tgggtaaaga aggccctttt      960
aaagtthtaa gcaactgcta catthataaa gacaccatcc aagtcaagct aatcgacttg      1020
agtcaggtaa tgtatctagt gggtgctgca caagctaaag ctcttccgtc accagctgcc      1080
accatttggg attatatcca caaaaccacc tcaattggaa tttatggacc caaatatata      1140
catcccagtt ttactgttgt tttaacagtt tgtggacaca attatatgcc aggacagctt      1200
acaatttctg atattaagaa ggggtgaaaa aacatatctc cagttgtgtt tcagctctgg      1260
gggaagcagt catthttact tgacaagcca caagatttaa gtatttctat tttttcctgt      1320

```

```

gatcctgatt ttgaagtaaa gacagaagga gaaaggaaag aaattaaaca aaagcagttg 1380
gaagcaggtg aagtagttca tcaacaattt ttatttttctt tagttgagca cagagagatg 1440
cacttgtttg atttttgtgt tcaagtggag cctcccaatg gtgaaccagt tgcacagttc 1500
tctatcacta ctctgatcc aaccccaaac ctaaaaagac tctcgaatct gccaggctat 1560
ttgcagaaga aggaggaaat caagtctgct cctttatcac caaaaattct tggttaaata 1620
cctacatttc aagataaaac attgaacttt agcaactatg gggtaaccct gaaggcagtg 1680
ctaagacaaa gcaagattga ttacttcctt gaatatttca aaggggacac aatagctctc 1740
ctcggggaag gtaaggtaaa agctattggt cagtccaaag tgaaagaatg gtatgtagga 1800
gtcctcagag gtaagattgg acttgtagac tgcaaaaatg tcaaggatgat ttcaaaggag 1860
caagtaatgt ttatgtcaga tagtgtcttt acaaccagaa atcttcttga acagattgtc 1920
ctgcctttaa aaaaattgac ttatatctac tcagttgtat taaccttggt gtcagaaaaa 1980
gtttatgatt ggaaagtttt agctgatgtc ctgggttact cacatctgtc cctggaagat 2040
tttgatcaaa ttcaagcaga caaagaatca gagaaagttt cttatgttat aaagaagtta 2100
aaggaagatt gccacacaga gagaaataca aggaagtttc tgtatgaact tattgtggct 2160
cttctgaaaa tggattgcca agagttagtc gcacgtctca tccaagaagc tgctgttctg 2220
acttcagctg tcaagcttgg aaaaggctgg agggaaactag ctgaaaagtt agtacgactc 2280
acaaagcaac aaatggaggc atatgaaatt cctcatcgag gaaacactgg agatgttgct 2340
gttgagatga tgtggaaacc tgcctatgat tttctgtata cctggagtgc tcactatgga 2400
aataactaca gagatgtgtt acaagacctt cagtcagctt tggacagaat gaaaaaccct 2460
gtgactaaac actggagaga attaaactgga gttttaatac tagtaaattc tttggagggt 2520
ttgagagtaa ctgcattctc cacttctgag gaagtatag 2559

```

<210> 2

<211> 852

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Leu Ile Thr Glu Arg Lys His Phe Arg Ser Gly Arg Ile Ala Gln
1           5           10           15

```

```

Ser Met Ser Glu Ala Asn Leu Ile Asp Met Glu Ala Gly Lys Leu Ser
          20           25           30

```

```

Lys Ser Cys Asn Ile Thr Glu Cys Gln Asp Pro Asp Leu Leu His Asn
          35           40           45

```

```

Trp Pro Asp Ala Phe Thr Leu Arg Gly Asn Asn Ala Ser Lys Val Ala

```

50

55

60

Asn Pro Phe Trp Asn Gln Leu Ser Ala Ser Asn Pro Phe Leu Asp Asp
65 70 75 80

Ile Thr Gln Leu Arg Asn Asn Arg Lys Arg Asn Asn Ile Ser Ile Leu
85 90 95

Lys Glu Asp Pro Phe Leu Phe Cys Arg Glu Ile Glu Asn Gly Asn Ser
100 105 110

Phe Asp Ser Ser Gly Asp Glu Leu Asp Val His Gln Leu Leu Arg Gln
115 120 125

Thr Ser Ser Arg Asn Ser Gly Arg Ser Lys Ser Val Ser Glu Leu Leu
130 135 140

Asp Ile Leu Asp Asp Thr Ala His Ala His Gln Ser Ile His Asn Ser
145 150 155 160

Asp Gln Ile Leu Leu His Asp Leu Glu Trp Leu Lys Asn Asp Arg Glu
165 170 175

Ala Tyr Lys Met Ala Trp Leu Ser Gln Arg Gln Leu Ala Arg Ser Cys
180 185 190

Leu Asp Leu Asn Thr Ile Ser Gln Ser Pro Gly Trp Ala Gln Thr Gln
195 200 205

Leu Ala Glu Val Thr Ile Ala Cys Lys Val Asn His Gln Gly Gly Ser
210 215 220

Val Gln Leu Pro Glu Ser Asp Ile Thr Val His Val Pro Gln Gly His
225 230 235 240

Val Ala Val Gly Glu Phe Gln Glu Val Ser Leu Arg Ala Phe Leu Asp
245 250 255

Pro Pro His Met Leu Asn His Asp Leu Ser Cys Thr Val Ser Pro Leu
260 265 270

Leu Glu Ile Met Leu Gly Asn Leu Asn Thr Met Glu Ala Leu Leu Leu
275 280 285

Glu Met Lys Ile Gly Ala Glu Val Arg Lys Asp Pro Phe Ser Gln Val
290 295 300

Met Thr Glu Met Val Cys Leu His Ser Leu Gly Lys Glu Gly Pro Phe
 305 310 315 320

Lys Val Leu Ser Asn Cys Tyr Ile Tyr Lys Asp Thr Ile Gln Val Lys
 325 330 335

Leu Ile Asp Leu Ser Gln Val Met Tyr Leu Val Val Ala Ala Gln Ala
 340 345 350

Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ala Ala Thr Ile Trp Asp Tyr Ile His Lys
 355 360 365

Thr Thr Ser Ile Gly Ile Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile His Pro Ser Phe
 370 375 380

Thr Val Val Leu Thr Val Cys Gly His Asn Tyr Met Pro Gly Gln Leu
 385 390 395 400

Thr Ile Ser Asp Ile Lys Lys Gly Gly Lys Asn Ile Ser Pro Val Val
 405 410 415

Phe Gln Leu Trp Gly Lys Gln Ser Phe Leu Leu Asp Lys Pro Gln Asp
 420 425 430

Leu Ser Ile Ser Ile Phe Ser Cys Asp Pro Asp Phe Glu Val Lys Thr
 435 440 445

Glu Gly Glu Arg Lys Glu Ile Lys Gln Lys Gln Leu Glu Ala Gly Glu
 450 455 460

Val Val His Gln Gln Phe Leu Phe Ser Leu Val Glu His Arg Glu Met
 465 470 475 480

His Leu Phe Asp Phe Cys Val Gln Val Glu Pro Pro Asn Gly Glu Pro
 485 490 495

Val Ala Gln Phe Ser Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Pro Asn Leu Lys
 500 505 510

Arg Leu Ser Asn Leu Pro Gly Tyr Leu Gln Lys Lys Glu Glu Ile Lys
 515 520 525

Ser Ala Pro Leu Ser Pro Lys Ile Leu Val Lys Tyr Pro Thr Phe Gln
 530 535 540

Asp Lys Thr Leu Asn Phe Ser Asn Tyr Gly Val Thr Leu Lys Ala Val
 545 550 555 560

Leu Arg Gln Ser Lys Ile Asp Tyr Phe Leu Glu Tyr Phe Lys Gly Asp
 565 570 575

Thr Ile Ala Leu Leu Gly Glu Gly Lys Val Lys Ala Ile Gly Gln Ser
 580 585 590

Lys Val Lys Glu Trp Tyr Val Gly Val Leu Arg Gly Lys Ile Gly Leu
 595 600 605

Val His Cys Lys Asn Val Lys Val Ile Ser Lys Glu Gln Val Met Phe
 610 615 620

Met Ser Asp Ser Val Phe Thr Thr Arg Asn Leu Leu Glu Gln Ile Val
 625 630 635 640

Leu Pro Leu Lys Lys Leu Thr Tyr Ile Tyr Ser Val Val Leu Thr Leu
 645 650 655

Val Ser Glu Lys Val Tyr Asp Trp Lys Val Leu Ala Asp Val Leu Gly
 660 665 670

Tyr Ser His Leu Ser Leu Glu Asp Phe Asp Gln Ile Gln Ala Asp Lys
 675 680 685

Glu Ser Glu Lys Val Ser Tyr Val Ile Lys Lys Leu Lys Glu Asp Cys
 690 695 700

His Thr Glu Arg Asn Thr Arg Lys Phe Leu Tyr Glu Leu Ile Val Ala
 705 710 715 720

Leu Leu Lys Met Asp Cys Gln Glu Leu Val Ala Arg Leu Ile Gln Glu
 725 730 735

Ala Ala Val Leu Thr Ser Ala Val Lys Leu Gly Lys Gly Trp Arg Glu
 740 745 750

Leu Ala Glu Lys Leu Val Arg Leu Thr Lys Gln Gln Met Glu Ala Tyr
 755 760 765

Glu Ile Pro His Arg Gly Asn Thr Gly Asp Val Ala Val Glu Met Met
 770 775 780

Trp Lys Pro Ala Tyr Asp Phe Leu Tyr Thr Trp Ser Ala His Tyr Gly
 785 790 795 800

Asn Asn Tyr Arg Asp Val Leu Gln Asp Leu Gln Ser Ala Leu Asp Arg
 805 810 815

Met Lys Asn Pro Val Thr Lys His Trp Arg Glu Leu Thr Gly Val Leu
 820 825 830

Ile Leu Val Asn Ser Leu Glu Val Leu Arg Val Thr Ala Phe Ser Thr
 835 840 845

Ser Glu Glu Val
 850

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 ttcttttgat tcctccggtg a 21

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 actctgatgg gcatgtgctg 20

<210> 5
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gcagacttcc tcaagaaatt ctggaagatc ta 32

<210> 6
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 agtgtttcag aacttctgga catttttagac ga 32

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 aagcttgga aaggctggag g 21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC/EP2004/008053

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/47 G01N33/574 C07K16/18 C12Q1/68 A61K38/17
A61K39/395 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 28 April 2003 (2003-04-28), INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM: "The DNA sequence of Homo sapiens: "similar to expressed sequence AI594717 'Homo sapiens!' XP002305044 Database accession no. XM_294213 the whole document	1,2,5,6
X	DATABASE Geneseq 'Online! 25 February 2003 (2003-02-25), "Human liver single exon probe, SEQ ID No 20133." XP002305045 retrieved from EBI accession no. GSN:ABS45143 Database accession no. ABS45143 the whole document -/--	3



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 November 2004

Date of mailing of the international search report

10/12/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Huber, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/008053

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>& WO 01/57273 A (CHEN WENSHENG ; HANZEL DAVID K (US); PENN SHARRON G (US); RANK DAVID R) 9 August 2001 (2001-08-09)</p> <p>-----</p> <p>DATABASE Geneseq 'Online! 2 August 2002 (2002-08-02), "Human colon cancer related nucleotide sequence SEQ ID NO:2340." XP002305046 retrieved from EBI accession no. GSN:ABQ58645 Database accession no. ABQ58645 the whole document & WO 02/29086 A (BURGESS CHRISTOPHER ; CARROLL EDDIE III (US); CATINO THEODORE J (US);) 11 April 2002 (2002-04-11)</p>	1-24
Y	<p>OTSUKA M ET AL: "Differential expression of the L-plastin gene in human colorectal cancer progression and metastasis" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, vol. 289, 2001, pages 876-881, XP002237813 ISSN: 0006-291X page 878, left-hand column, paragraph 2 - page 878, right-hand column, paragraph 1 page 879, left-hand column, paragraph 3 - page 880, right-hand column, paragraph 1</p>	1-24
A	<p>BRETT DAVID ET AL: "A rapid bioinformatic method identifies novel genes with direct clinical relevance to colon cancer" ONCOGENE, vol. 20, no. 33, 27 July 2001 (2001-07-27), pages 4581-4585, XP002305305 ISSN: 0950-9232 abstract</p>	1
A	<p>KNOESEL THOMAS ET AL: "Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases" VIRCHOWS ARCHIV, vol. 440, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 187-194, XP002305505 ISSN: 0945-6317 page 191, right-hand column, last paragraph - page 192, left-hand column, paragraph 1</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/008053

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>DATABASE UniProt 'Online! 1 October 2003 (2003-10-01), SCHWABE ET AL.: "Putative binding protein 7a5." XP002305047 retrieved from EBI accession no. UNIPROT:Q7Z5A5 Database accession no. Q7Z5A5 the whole document -----</p>	1,2,4-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP2004/008053

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **18 (in part)**

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 14-16 and 19-22 relate to a method for treatment and/or diagnosis of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

2. ☒ Claims Nos.: **18 (in part)**

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

SEE SUPPLEMENTAL SHEET PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of II.1

Although claims 14-16 and 19-22 relate to a method for treatment and/or diagnosis of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

Continuation of II.2

Claim: 18 (in part)

Claim 18 relates to a method of preparing a pharmaceutical composition, comprising the formulation of a yet to be identified substance that binds to 7a5/prognostin into a pharmaceutically acceptable form. The claim comprises all substances that have this property or characteristic. Claim 18 thus relates to an inordinately large number of possible compounds, of which only a small portion are supported by the description (PCT Article 6) and/or can be regarded as having been disclosed in the application (PCT Article 5). In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear to be supported and disclosed in the above sense, that is the parts concerning antibodies against 7a5/prognostin and considered to be 7a5/prognostin-binding substances.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. After entry into the regional phase before the EPO, however, an additional search can be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, Part C, VI, 8.5) if the deficiencies that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/008053

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0157273	A	09-08-2001	AU 3087801 A	14-08-2001
			AU 3087901 A	14-08-2001
			AU 3088001 A	14-08-2001
			AU 3088101 A	14-08-2001
			AU 3088201 A	14-08-2001
			AU 3088301 A	14-08-2001
			AU 3275701 A	14-08-2001
			AU 3275801 A	20-11-2001
			AU 3275901 A	14-08-2001
			AU 3276001 A	14-08-2001
			AU 3311401 A	14-08-2001
			AU 3658901 A	14-08-2001
			AU 6343201 A	11-12-2001
			AU 9295701 A	02-04-2002
			EP 1309723 A2	14-05-2003
			EP 1309724 A2	14-05-2003
			EP 1292704 A2	19-03-2003
			EP 1325149 A2	09-07-2003
			EP 1292705 A2	19-03-2003
			EP 1290216 A2	12-03-2003
			EP 1341930 A2	10-09-2003
			EP 1332224 A2	06-08-2003
			EP 1325150 A2	09-07-2003
			EP 1309725 A2	14-05-2003
			EP 1290217 A2	12-03-2003
			GB 2361238 A ,B	17-10-2001
			GB 2373500 A	25-09-2002
			GB 2374929 A	30-10-2002
			GB 2383043 A	18-06-2003
			GB 2375539 A	20-11-2002
			GB 2375111 A	06-11-2002
			GB 2374872 A	30-10-2002
			GB 2378754 A	19-02-2003
			GB 2382814 A	11-06-2003
			GB 2385053 A	13-08-2003
			GB 2376018 A	04-12-2002
			GB 2376237 A	11-12-2002
			GB 2380197 A	02-04-2003
			GB 2396351 A ,B	23-06-2004
			GB 2396352 A ,B	23-06-2004
			GB 2397376 A	21-07-2004
			JP 2004501617 T	22-01-2004
			WO 0157270 A2	09-08-2001
			WO 0157271 A2	09-08-2001
			WO 0157272 A2	09-08-2001
			WO 0157273 A2	09-08-2001
			WO 0186003 A2	15-11-2001
			WO 0157274 A2	09-08-2001
			WO 0157275 A2	09-08-2001
			WO 0157276 A2	09-08-2001
WO 0229086	A	11-04-2002	AU 9494301 A	15-04-2002
			EP 1330543 A2	30-07-2003
			JP 2004528810 T	24-09-2004
			WO 0229086 A2	11-04-2002
			US 2004110668 A1	10-06-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/008053

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/47 G01N33/574 C07K16/18 C12Q1/68 A61K38/17
A61K39/395 A61P35/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte(r) Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 28. April 2003 (2003-04-28), INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM: "The DNA sequence of Homo sapiens: "similar to expressed sequence AI594717 'Homo sapiens!' XP002305044 Database accession no. XM_294213 das ganze Dokument	1,2,5,6
X	DATABASE Geneseq 'Online! 25. Februar 2003 (2003-02-25), "Human liver single exon probe, SEQ ID No 20133." XP002305045 gefunden im EBI accession no. GSN:ABS45143 Database accession no. ABS45143 das ganze Dokument -/-	3

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. November 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

10/12/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Huber, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/008053

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>& WO 01/57273 A (CHEN WENSHENG ; HANZEL DAVID K (US); PENN SHARRON G (US); RANK DAVID R) 9. August 2001 (2001-08-09)</p> <p>-----</p> <p>DATABASE Geneseq 'Online! 2. August 2002 (2002-08-02), "Human colon cancer related nucleotide sequence SEQ ID NO:2340." XP002305046 gefunden im EBI accession no. GSN:ABQ58645 Database accession no. ABQ58645 das ganze Dokument & WO 02/29086 A (BURGESS CHRISTOPHER ; CARROLL EDDIE III (US); CATINO THEODORE J (US);) 11. April 2002 (2002-04-11)</p>	1-24
Y	<p>OTSUKA M ET AL: "Differential expression of the L-plastin gene in human colorectal cancer progression and metastasis" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, US, Bd. 289, 2001, Seiten 876-881, XP002237813 ISSN: 0006-291X Seite 878, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 878, rechte Spalte, Absatz 1 Seite 879, linke Spalte, Absatz 3 - Seite 880, rechte Spalte, Absatz 1</p>	1-24
A	<p>BRETT DAVID ET AL: "A rapid bioinformatic method identifies novel genes with direct clinical relevance to colon cancer" ONCOGENE, Bd. 20, Nr. 33, 27. Juli 2001 (2001-07-27), Seiten 4581-4585, XP002305305 ISSN: 0950-9232 Zusammenfassung</p>	1
A	<p>KNOESEL THOMAS ET AL: "Incidence of chromosomal imbalances in advanced colorectal carcinomas and their metastases" VIRCHOWS ARCHIV, Bd. 440, Nr. 2, Februar 2002 (2002-02), Seiten 187-194, XP002305505 ISSN: 0945-6317 Seite 191, rechte Spalte, letzter Absatz - Seite 192, linke Spalte, Absatz 1</p> <p>-----</p> <p>-/--</p>	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/008053

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
P,X	<p>DATABASE UniProt 'Online! 1. Oktober 2003 (2003-10-01), SCHWABE ET AL.: "Putative binding protein 7a5." XP002305047 gefunden im EBI accession no. UNIPROT:Q7Z5A5 Database accession no. Q7Z5A5 das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1,2,4-6

INTERNÄTIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/008053

Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 18 (teilweise)
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Obwohl sich die Ansprüche 14-16 und 19-22 auf Verfahren zur Behandlung und/oder Diagnose des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☒ Ansprüche Nr. 18 (teilweise)
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe BEIBLATT PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld II.1

Obwohl sich die Ansprüche 14-16 und 19-22 auf Verfahren zur Behandlung und/oder Diagnose des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

Fortsetzung von Feld II.2

Ansprüche Nr.: 18 (teilweise)

Anspruch 18 bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, umfassend das Formulieren einer zu identifizierenden Substanz, welche an 7a5/Prognostin binden soll, in eine pharmazeutisch akzeptable Form. Der Patentanspruch umfasst alle Substanzen, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen. Somit bezieht sich Anspruch 18 auf eine unverhältnismässig grosse Zahl möglicher Verbindungen, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Artikels 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Artikels 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Masse, dass eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die nämlich die Teile, welche gegen 7a5/Prognostin gerichtete Antikörper betreffen und die als 7a5/Prognostin-bindende Substanzen angesehen werden.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit, der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäss Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8.5), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäss Art. 17 (2) PCT geführt haben.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/008053

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0157273 A	09-08-2001	AU 3087801 A	14-08-2001
		AU 3087901 A	14-08-2001
		AU 3088001 A	14-08-2001
		AU 3088101 A	14-08-2001
		AU 3088201 A	14-08-2001
		AU 3088301 A	14-08-2001
		AU 3275701 A	14-08-2001
		AU 3275801 A	20-11-2001
		AU 3275901 A	14-08-2001
		AU 3276001 A	14-08-2001
		AU 3311401 A	14-08-2001
		AU 3658901 A	14-08-2001
		AU 6343201 A	11-12-2001
		AU 9295701 A	02-04-2002
		EP 1309723 A2	14-05-2003
		EP 1309724 A2	14-05-2003
		EP 1292704 A2	19-03-2003
		EP 1325149 A2	09-07-2003
		EP 1292705 A2	19-03-2003
		EP 1290216 A2	12-03-2003
		EP 1341930 A2	10-09-2003
		EP 1332224 A2	06-08-2003
		EP 1325150 A2	09-07-2003
		EP 1309725 A2	14-05-2003
		EP 1290217 A2	12-03-2003
		GB 2361238 A ,B	17-10-2001
		GB 2373500 A	25-09-2002
		GB 2374929 A	30-10-2002
		GB 2383043 A	18-06-2003
		GB 2375539 A	20-11-2002
		GB 2375111 A	06-11-2002
		GB 2374872 A	30-10-2002
		GB 2378754 A	19-02-2003
		GB 2382814 A	11-06-2003
		GB 2385053 A	13-08-2003
		GB 2376018 A	04-12-2002
		GB 2376237 A	11-12-2002
		GB 2380197 A	02-04-2003
		GB 2396351 A ,B	23-06-2004
		GB 2396352 A ,B	23-06-2004
		GB 2397376 A	21-07-2004
		JP 2004501617 T	22-01-2004
		WO 0157270 A2	09-08-2001
		WO 0157271 A2	09-08-2001
		WO 0157272 A2	09-08-2001
		WO 0157273 A2	09-08-2001
		WO 0186003 A2	15-11-2001
		WO 0157274 A2	09-08-2001
		WO 0157275 A2	09-08-2001
		WO 0157276 A2	09-08-2001
WO 0229086 A	11-04-2002	AU 9494301 A	15-04-2002
		EP 1330543 A2	30-07-2003
		JP 2004528810 T	24-09-2004
		WO 0229086 A2	11-04-2002
		US 2004110668 A1	10-06-2004